

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Aline Jade Costa Mendonça

**SINAPTOPATIA COCLEAR INDUZIDA PELO RUÍDO: PERFIL EM 69
LINHAGENS DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Cirúrgicas para
obtenção do Título de Mestrado em
Medicina: Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Joel Lavinsky

2020

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Aline Jade Costa Mendonça

**SINAPTOPATIA COCLEAR INDUZIDA PELO RUÍDO: PERFIL EM 69
LINHAGENS DE CAMUNDONGOS**

Orientador: Prof. Dr. Joel Lavinsky

2020



CIP - Catalogação na Publicação

Mendonça, Aline Jade Costa Mendonça
SINAPTOPATIA COCLEAR INDUZIDA PELO RUÍDO: PERFIL EM
69 LINHAGENS DE CAMUNDONGOS / Aline Jade Costa
Mendonça Mendonça. -- 2020.
72 f.
Orientador: Joel Lavinsky.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2020.

1. Otorrinolaringologia. 2. Otologia. 3. Audição.
4. Perda Auditiva Induzida pelo Ruído. 5.
Sinaptopatia. I. Lavinsky, Joel, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus incentivadores e exemplos. Aos meus avós pelos ensinamentos.

Ao meu esposo, pelo apoio e por sempre estar ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Joel Lavinsky, exemplo de competência e capacidade técnica como médico e professor.

SUMÁRIO

1. Lista de Abreviaturas e Siglas.....	7
2. Lista de Tabelas.....	8
2.1. Tabela da Revisão de Literatura	8
2.2. Tabela do Artigo em Língua Portuguesa	8
3. Lista de Gráficos	9
3.1. Gráficos do Artigo em Língua Portuguesa	9
4. Introdução	10
5. Revisão da Literatura.....	18
5.1. Perda Auditiva Induzida pelo Ruído	18
5.1.1. Definição	18
5.1.2. Aspectos Históricos	18
5.1.3. Epidemiologia	18
5.1.4. Fisiopatogenia	19
5.1.4.1 Dano Mecânico	20
5.1.4.2 Dano Metabólico	20
5.1.4.3 Sobrecarga de Cálcio	21
5.1.4.4 Dano Imune e Inflamatório	21
5.1.4.5 Fatores Genéticos	21

5.1.5. Aspectos Clínicos e História Natural	22
5.1.6. Critérios Diagnósticos	23
5.1.7. Exames	23
5.1.7.1 Audiometria Tonal	23
5.1.7.2 Reconhecimento de Fala	24
5.1.7.3 Emissões Otoacústicas	24
5.1.7.4 Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico	24
5.1.7.5 Eletrococleografia	25
5.1.8. Perda Auditiva Silenciosa	25
5.1.9. Prevenção	25
5.1.10. Tratamento	26
5.2. Hybrid Mouse Diversity Panel	27
6. Objetivo	30
6.1. Objetivo Geral	30
6.2. Objetivo Específico	30
7. Artigo 1 - em Língua Portuguesa	31
8. Artigo 1 - em Língua Inglesa	43
9. ARTIGO 2.....	55
10. Anexos	69
10.1. Tabela Suplementar 1	69

1. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCI – Células Ciliadas Internas

CCE – Células Ciliadas Externas

ATP – Adenosina Trifosfato

PEATE / BERA - Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico / Brainstem Evoked Response Audiometry

kHz – Quilo-Hertz

Hz – Hertz

PAIR – Perda Auditiva Induzida pelo Ruído

dB – Decibel

NPS – Nível de Pressão Sonora

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

PNS – Perda Neurossensorial

EOA – Emissões Otoacústicas Evocadas

SP – Potencial de Somação

AP – Potencial de Ação

HMDP – Hybrid Mouse Diversity Panel

GWAS – Genome-wide Association Study

ms – Milissegundo

NIHL – Noise Induced Hearing Loss

ARHL – Age Related Hearing Loss

TTS – Temporary Threshold Shift

IHC – Inner Hair Cell

ANF – Auditory Nerve Fiber

ABR – Auditory Brainstem Response

2. LISTA DE TABELAS

2.1. Tabela da Revisão de Literatura

Tabela 1. Nível de Ruído em Decibéis

2.2. Tabela do Artigo em Língua Portuguesa

Tabela Suplementar 1. Números de camundongos por linhagem, valores da amplitude da onda I do BERA basal e pós exposição a ruído em μV

3. LISTA DE GRÁFICOS

3.1. Gráficos do Artigo em Língua Portuguesa

Gráfico 1. Delta da amplitude da onda I do BERA basal e pós exposição a ruídos, média em μV por linhagem em cada frequência

Gráfico 2. Dispersão da correlação entre a média da amplitude da onda I do BERA por linhagem e a média da variação da amplitude após exposição a ruído

4. INTRODUÇÃO

A sensação de ouvir é o resultado de impulsos mecânicos (ondas sonoras) sendo transmitidos através do fluído que preenche a cóclea e que são codificados a impulsos neuronais que viajam ao longo do nervo auditivo cranialmente em direção ao córtex cerebral.¹

A audição começa quando o pavilhão da orelha capta as ondas sonoras e as conduz pelo canal auditivo externo até o tímpano, que vibra e dispõem os ossículos da orelha média em movimento. As vibrações resultantes seguem seu caminho para o fluído da orelha interna que preenche a estrutura tubular da cóclea – onde estão localizadas as células ciliadas que ocupam uma faixa de tecido espiralar conhecida como órgão de Corti. As células ciliadas têm este nome por conter protruções semelhantes a cílios em sua superfície, os estereocílios.²

Na orelha interna dos mamíferos, as células ciliadas internas agem como transdutores mecano-elétricos, liberando neurotransmissores para excitarem as fibras sensitivas do nervo coclear – sinapses glutamatérgicas com fibras ascendentes do nervo coclear.³ Quando as ondas sonoras movimentam os cílios das células ciliadas, estas convertem vibrações em sinais químicos, liberando glutamato.² Na sinapse, o glutamato se liga a receptores de uma fibra do nervo auditivo. Cada terminal está na extremidade de uma célula nervosa que projeta uma longa fibra, um axônio, à sua outra extremidade no tronco cerebral. A ligação do glutamato libera um sinal elétrico que viaja a extensão do nervo auditivo ao tronco cerebral, ao mesencéfalo e tálamo, finalizando sua jornada no córtex auditivo.² As fibras do nervo coclear contatam apenas uma célula ciliada interna (CCI), com uma única zona ativa, com apenas um terminal pré-sináptico ligado à membrana da CCI.³

A sinapse das células ciliadas internas com o nervo coclear é ponto inicial através do qual a informação acústica é transmitida ao sistema nervoso central. Em uma orelha normal, 95% das fibras do nervo coclear fazem comunicação sináptica apenas com CCIs.⁴

As células ciliadas externas (CCE) atuam como motores biológicos, amplificando a movimentação do epitélio sensitivo.³

A habilidade de ouvir e compreender à medida em que envelhecemos é determinada pela conectividade neural das CCI com a cóclea e pelos seus contatos com fibras do nervo auditivo.¹

Após superexposição a ruído os limiares auditivos podem elevar e depois serem recuperados completamente (elevação temporária dos limiares) ou ficarem estabilizados em um valor elevado (elevação permanente dos limiares).³

A elevação permanente dos limiares auditivos ocorre devido a destruição das células ciliadas cocleares ou lesão ao mecanismo mecano-sensorial das células ciliadas. As células ciliadas transduzem um movimento mecânico evocado pelo som em potenciais elétricos, que levam a liberação do transmissor glutamato nas suas sinapses com as fibras aferentes do nervo coclear. Dano às células ciliadas pode ser visível em minutos após a superexposição a ruído, e a morte das células ciliadas pode continuar acontecendo por dias após a exposição a ruído.³ Já a perda de células do gânglio espiral, o corpo celular dos neurônios aferentes cocleares que fazem contato com as células ciliadas, é retardada por meses e pode progredir por anos após o dano causado pelo ruído.³ Não há morte de células ciliadas em elevação transitória dos limiares, o que ocorre é um edema dos terminais do nervo coclear nas suas sinapses, sugestiva de excito-toxicidade pelo glutamato, que já pode ser visto 24h depois da exposição.³

Exposição intensa a ruídos induz estresse metabólico severo na cóclea, devido à sobrecarga intracelular das CCI de cálcio, depleção de adenosina trifosfato (ATP) e superprodução de espécies reativas de oxigênio, levando a perda de CCIs e elevação permanente dos limiares.⁵

Exposição moderada a ruído que não causa dano às células ciliadas ou alteração permanente dos limiares auditivos, pode destruir sinapses entre as células ciliadas e terminações nervosas do nervo auditivo, o que não afeta os limiares auditivos audiométricos, mas reduz amplitude nas respostas aos potenciais evocados supra limiares, podendo ser detectado no Potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE / BERA).⁶

O BERA (*Brainstem Evoked Response Audiometry*) é um potencial auditivo evocado por som, gerado por circuitos neuronais nas vias auditivas ascendentes. É frequentemente utilizado para determinação dos limiares auditivos em crianças e em animais. A onda I do BERA representa a atividade somada do nervo coclear.^{3,7} O Pico da onda I do BERA em camundongos é robusto, enquanto o pico da onda V é mais robusto em humanos e frequentemente indetectável em camundongos.⁷ O BERA não é afetado pela maioria das drogas sedativas comumente usadas em anestesia, mesmo em doses que deixem os pacientes comatosos, com um traçado plano no eletroencefalograma.⁷ A confiabilidade, sensibilidade e natureza não invasiva do BERA o torna a primeira escolha para avaliação de limiares auditivos em camundongos.⁷ A amplitude supra limiar da onda I do BERA pode ser altamente preditiva do grau de sinaptopatia, já que os neurônios afetados são silenciados com a perda das suas sinapses com as CCI.⁴

Em experimentos com camundongos, a exposição a ruído leva a uma redução permanente da amplitude da onda I do BERA, apesar da recuperação das emissões otoacústicas e dos limiares auditivos no BERA, o que demonstra a forte correlação da amplitude da onda I com a integridades das sinapses auditivas e/ou as fibras dos nervo auditivo.⁸

Considerando que um único neurônio comunica com uma única CCI via uma única sinapse, e que cada fibra contribui com uma pequena parte para o conjunto dos potenciais, a fração reduzida na amplitude da onda I do BERA teria uma escala linear com a fração reduzida de conexões sinápticas.⁴

Em orelhas expostas ao ruído não houve perda de CCI e nem de CCE em até 1 ano após a exposição.³ Apesar de mantida a população normal de células ciliadas, houve degeneração dramática de elementos pré e pós-sinápticos na área das CCIs da região de alta frequência (basal) da cóclea. Esta degeneração foi observada em todos os períodos pós exposição, iniciando em 24h. Os botões pré-sinápticos estavam em menor número, vários dos remanescentes estavam anormalmente alargados e alguns deslocados da membrana baso-lateral das CCIs em direção ao núcleo.³

Nas orelhas expostas a ruído, a densidade de fibras na região das CCI foi reduzida em proporção a perda dos botões sinápticos. A contagem dos botões sinápticos em orelhas expostas a ruído deve subestimar a degeneração neuronal, pois muitos destes botões incluídos na contagem estão afastados da membrana basolateral e não nas zonas ativas onde os terminais estão presentes.³

A região de 32 kHz das cócleas das orelhas expostas a ruído, é onde a mudança aguda de limiar é maior e onde a redução permanente da amplitude do BERA sugere perda neuronal mais significativa.³

Apesar da perda dos terminais periféricos dos neurônios cocleares ser rápida, a morte celular e o seu desaparecimento é lento. Liberman et al. realizaram a contagem de células do gânglio espiral na região de 32kHz e seu número estava próximo ao normal após 2 semanas da exposição, porém ocorreu uma redução importante a cada ano e ao final de 2 anos, a contagem celular reduziu em torno de 50%, comparável a perda dos botões sinápticos vista nas primeiras 24h após exposição.³

Estes achados têm relevância em humanos. A perda de neurônios cocleares deve reduzir a robustez da codificação do estímulo em condições de ambiente ruidoso, por exemplo na discriminação da fala em ambiente ruidoso, nos quais a soma espacial via convergência da atividade de grupos de neurônios deve ser importante no processamento de sinal. Estas alterações contribuem para outras anomalias perceptuais, incluindo zumbido e hiperacusia, clássicas sequelas de superexposição ao ruído que podem ocorrer com ou sem elevação dos limiares.³

Em humanos a dificuldade de compreender a fala em ambientes ruidosos foi relacionada ao que se chama de “perda auditiva silenciosa”, que seria o resultado de destruição de sinapses das CCI com os neurônios do nervo auditivo, o que resulta em denervação e também lenta degeneração dos neurônios do gânglio espiral.⁴

Zumbido é a percepção de som no silêncio e é frequentemente precedida por superexposição a ruídos. Dano pelo ruído tipicamente reduz descargas espontâneas no nervo auditivo e em contrapartida aumenta descargas

espontâneas nas vias auditivas centrais.⁶ Porém, esta relação não é linear: entre animais com a mesma exposição a ruídos, nem todos demonstram alteração nas descargas espontâneas ou zumbido.⁶ Apesar de alteração nos limiares auditivos ser um fator de risco primário para o zumbido em humanos, zumbido pode acontecer sem elevação dos limiares.⁶ O zumbido e a hiperacusia podem ser o resultado de uma plasticidade compensatória, onde ocorre um ganho compensatório na sinapse do sistema auditivo central devido a atenuação do sinal da sinapse auditiva periférica.⁴

Audiogramas registram nossa habilidade em detectar tons em intervalos de uma oitava de frequência, 250, 500, 1.000, 2.000, 4.000 e 8.000 Hz.⁶ O audiograma mede o limiar auditivo e é um sistema sensível ao dano às células ciliadas, mas é um indicador muito precário de danos às fibras do nervo auditivo.² A audiometria tonal é uma chave fundamental provendo documentação da magnitude da perda auditiva. Seu padrão é uma função da frequência e, em alguma extensão, da localidade da disfunção (orelha média, orelha interna). Mas é sabido, entretanto, que os limiares audiométricos não estão completamente alinhados às dificuldades perceptuais auditivas.⁴ A detecção comportamental de limiares auditivos tonais apresenta poucas mudanças até que a perda neuronal exceda 80-90%.⁴ Nos estágios iniciais da perda auditiva induzida por ruído (PAIR), vemos um entalhe nas frequências médias no audiograma, por volta de 4.000 Hz, que tendem a se espalhar para outras frequências contíguas ao longo do tempo de exposição.⁶

Alguns danos à orelha interna causados pelo ruído podem não afetar a detecção de tons na audiometria, mas podem alterar a habilidade de processar sinais mais complexo, o que tem sido chamado de perda auditiva “silenciosa”, pois um audiograma normal pode ocultar o dano ao nervo e o déficit auditivo associado.² A sinaptopatia coclear pode estar disseminada em orelhas com populações de células ciliadas intactas e audiogramas normais.⁴ Este dano deve contribuir à deterioração gradual na habilidade dos mais idosos em discriminar a fala.²

É sabido que os indivíduos apresentam diferença na susceptibilidade aos danos ocasionados por ruído. Os efeitos do ruído na audição resultam de uma combinação complexa de duração, intensidade e frequência dos sons aos quais as pessoas são expostas.²

Precisamos de melhores testes diagnósticos para identificar dano ao nervo auditivo. A avaliação das ondas do BERA é uma estratégia promissora. Em animais Liberman et al. demonstraram que a amplitude do BERA em níveis de sons elevados cresce em proporção ao número de fibras do nervo auditivo.²

Referências Bibliográficas da Introdução:

1. Boussaty EC, Gillard D, Lavinsky J, et al. The Genetics of Variation of the Wave 1 Amplitude of the Mouse Auditory Brainstem Response. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2020;21(4):323-336. doi:10.1007/s10162-020-00762-3
2. Liberman MC. Hidden Hearing Loss. *Sci Am*. 2015;313(2):48-53. doi:10.1038/scientificamerican0815-48
3. Kujawa SG, Liberman MC. Adding Insult to Injury: Cochlear Nerve Degeneration after “Temporary” Noise-Induced Hearing Loss. *J Neurosci*. 2009;29(45):14077-14085. doi:10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009
4. Liberman MC, Kujawa SG. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear Res*. 2017;349:138-147. doi:10.1016/j.heares.2017.01.003
5. Liu H, Lu J, Wang Z, et al. Functional alteration of ribbon synapses in inner hair cells by noise exposure causing hidden hearing loss. *Neurosci Lett*. 2019;707:134268. doi:10.1016/j.neulet.2019.05.022
6. Shaheen LA, Liberman MC. Cochlear Synaptopathy Changes Sound-Evoked Activity Without Changing Spontaneous Discharge in the Mouse Inferior Colliculus. *Front Syst Neurosci*. 2018;12. doi:10.3389/fnsys.2018.00059
7. Zheng QY, Johnson KR, Erway LC. Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hear Res*. 1999;130(1-2):94-107. doi:10.1016/S0378-5955(99)00003-9
8. Kobel M, Le Prell CG, Liu J, Hawks JW, Bao J. Noise-induced cochlear synaptopathy: Past findings and future studies. *Hear Res*. 2017;349:148-154. doi:10.1016/j.heares.2016.12.008
9. Lavinsky J, Crow AL, Pan C, et al. Genome-Wide Association Study Identifies Nox3 as a Critical Gene for Susceptibility to Noise-Induced Hearing Loss. Avraham KB, ed. *PLOS Genet*. 2015;11(4):e1005094. doi:10.1371/journal.pgen.1005094
10. Kujawa SG, Liberman MC. Translating animal models to human therapeutics in noise-induced and age-related hearing loss. *Hear Res*. 2019;377:44-52. doi:10.1016/j.heares.2019.03.003

11. Stucken EZ, Hong RS. Noise-induced hearing loss: an occupational medicine perspective. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;22(5):388-393. doi:10.1097/MOO.0000000000000079
12. Myint A, White CH, Ohmen JD, et al. Large-scale phenotyping of noise-induced hearing loss in 100 strains of mice. *Hear Res*. 2016;332:113-120. doi:10.1016/j.heares.2015.12.006
13. Mehraei G, Hickox AE, Bharadwaj HM, et al. Auditory Brainstem Response Latency in Noise as a Marker of Cochlear Synaptopathy. *J Neurosci*. 2016;36(13):3755-3764. doi:10.1523/JNEUROSCI.4460-15.2016
14. Kumar G, Amen F, Roy D. Normal hearing tests: is a further appointment really necessary? :1.
15. Hind SE, Haines-Bazrafshan R, Benton CL, Brassington W, Towle B, Moore DR. Prevalence of clinical referrals having hearing thresholds within normal limits. *Int J Audiol*. 2011;50(10):708-716. doi:10.3109/14992027.2011.582049
16. Liberman MC. Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. *F1000Research*. 2017;6:927. doi:10.12688/f1000research.11310.1
17. Lin C-Y, Wu J-L, Shih T-S, Tsai P-J, Sun Y-M, Guo YL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms as susceptibility factors for noise-induced temporary threshold shift. *Hear Res*. 2009;257(1-2):8-15. doi:10.1016/j.heares.2009.07.008
18. Bharadwaj HM, Masud S, Mehraei G, Verhulst S, Shinn-Cunningham BG. Individual Differences Reveal Correlates of Hidden Hearing Deficits. *J Neurosci*. 2015;35(5):2161-2172. doi:10.1523/JNEUROSCI.3915-14.2015
19. DeBacker JR, Harrison RT, Bielefeld EC. Cisplatin-induced threshold shift in the CBA/CaJ, C57BL/6J, BALB/cJ mouse models of hearing loss. *Hear Res*. 2020;387:107878. doi:10.1016/j.heares.2019.107878
20. Ohlemiller KK, Wright JS, Heidbreder AF. Vulnerability to noise-induced hearing loss in 'middle-aged' and young adult mice: a dose-response approach in CBA, C57BL, and BALB inbred strains. *Hear Res*. 2000;149(1-2):239-247. doi:10.1016/S0378-5955(00)00191-X
21. Wu W-J, Sha S-H, McLaren JD, Kawamoto K, Raphael Y, Schacht J. Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hear Res*. 2001;158(1-2):165-178. doi:10.1016/S0378-5955(01)00303-3

5. REVISÃO DA LITERATURA

5.1. Perda Auditiva Induzida pelo Ruído (PAIR)

5.1.1. Definição

Perda Auditiva Induzida pelo Ruído (PAIR) é uma surdez sensorineural causada por exposição prolongada a ruído.¹

É a segunda principal causa de perda auditiva, ficando atrás apenas na perda auditiva relacionada ao envelhecimento. PAIR é a principal causa de perda auditiva passível de prevenção.

5.1.2. Aspectos Históricos

As mudanças sociais aumentaram a exposição das pessoas ao ruído. A PAIR é um condição que foi difundida no século XX com o ruído industrial e exposição militar durante a II Guerra Mundial.² Desde a revolução industrial, a PAIR se tornou uma das principais doenças ocupacionais.

Atividades de lazer como shows com música alta, uso de fones de ouvido e caça esportiva também não devem ser negligenciadas como causadores de perda de audição.²

PAIR já foi reconhecida como uma doença ocupacional. As ocupações em maior risco para PAIR seriam mineração, manufatura de produtos em madeira, construção civil.³

5.1.3. Epidemiologia

Mais de 5% da população mundial – ou 466 milhões de pessoas- tem perda auditiva incapacitante. É estimado que até o ano de 2050 mais de 900 milhões de pessoas – 1 a cada 10 pessoas – terá perda auditiva incapacitante (OMS março de 2020). PAIR é a segunda causa mais comum de perda auditiva adquirida na maioria dos países, ficando atrás apenas da presbiacusia.¹ A exposição a ruído excessivo é a causa mais comum de perda auditiva prevenível.³

Perda auditiva é mais prevalente entre os homens em comparação às mulheres, provavelmente devido a desproporção no número de homens que têm ocupação com trabalhos com elevada exposição a ruído.³

5.1.4. Fisiopatogenia

PAIR é uma doença complexa que resulta da interação de fatores genéticos e ambientais, sua apresentação depende da extensão do dano causado pela exposição ao ruído.³

O quanto de ruído que um indivíduo pode ser exposto é expresso em termos de níveis de energia. Os níveis de energia são uma função da pressão sonora em decibéis (dB) e da duração da exposição ao longo do tempo. O princípio da conservação de energia afirma que uma mesma energia, depois de uma curta exposição a um ruído muito alto, pode causar o mesmo dano coclear de uma exposição prolongada a um nível de ruído inferior.³

Ruídos acima de 85dB podem causar PAIR.¹ Níveis mais altos de exposição normalmente ocorrem em ambientes laborais (como fábricas) ou recreacionais (músicos amadores, concertos). Como a intensidade de ruído ocorre em uma escala logarítmica, aumento na intensidade sonora de 3 dB, irá dobrar a energia produzida. Devido a este princípio, cada vez que dobra a intensidade sonora acima de 85dB, o tempo seguro de exposição cai pela metade.²

Pessoas expostas a sons excedendo 89 dB por mais de 5 horas por semana podem sofrer dano auditivo permanente ao longo do tempo.⁴

Outros fatores de riscos que podem induzir a progressão de PAIR são: tabagismo, diabetes, sedentarismo, envelhecimento e genética.¹ Alguns fatores de risco se sobrepõem aos sinais de síndrome metabólica, incluindo circunferência abdominal aumentada, níveis elevados de triglicerídeos, hipertensão e resistência a insulina, o que sugere um risco em potencial de comprometimento vascular à orelha interna e à cóclea no desenvolvimento de PAIR.⁴ Outros fatores ambientais que podem corroborar com a perda são: solventes orgânicos, substâncias ototóxicas (como aminoglicosídeos e monóxido de carbono), calor e vibração.²

Tabela1: Nível de Ruído em Decibéis

Nível de Decibel (dB)	Fonte
0	Menor som audível
30	Sussurro a 1 metro
50-65	Conversa normal
80-85	Trânsito na cidade
95-100	Motocicleta
110-120	Boate
110-140	Show de Rock

Se a intensidade do som é extremamente alta e a duração muito curta, como por exemplo um tiro de canhão, pode resultar em dano severo agudo ao sistema auditivo, chamado de trauma acústico. Intensidade sonora excedendo 140 dB pode causar perda auditiva severa e zumbido imediatamente após a exposição. Trauma acústico também pode ser acompanhado de perfuração da membrana timpânica e sangramento.¹

Quando a pressão sonora é mais moderada e apresentada em longas durações, como no ruído de fábricas, não há dano óbvio à orelha média, mas sim uma degeneração progressiva das células sensoriais da orelha interna, CCI e externas, assim como das fibras do nervo coclear.⁵ Exposição prolongada ao ruído pode levar a apoptose das células ciliadas e degeneração dos neurônios do gânglio espiral, o que resulta em queda no percentual de discriminação de fala e elevação dos limiares auditivos.¹ Com intensidade e duração suficientes, não apenas as células ciliadas, mas todo o órgão de Corti pode ser danificado.³

Como as células sensoriais e os neurônios não regeneram, na orelha interna dos mamíferos, a perda auditiva que a descrita degeneração causa é permanente e progressiva com o crescente tempo de exposição ao ruído.⁵

5.1.4.1. Dano Mecânico

Quando a intensidade sonora é extremamente alta, a energia sonora que é transmitida a orelha interna causa movimentação violenta da perilinfa e da endolinfa. A membrana basilar e a membrana tectórica são movidas violentamente, o que levaria a separação dos cílios das células ciliadas internas e externas. A vibração pode também separar as células ciliadas da membrana basilar, resultando em destruição das sinapses. Isso resultaria em dificuldade na compreensão de fala em ambientes ruidosos e elevação dos limiares.¹ Este mecanismo ocorre em exposições a intensidade sonora superior a 130dB nível de pressão sonora (NPS).³ Este mecanismo tem menor variabilidade individual e é menos dependente do tempo de exposição.²

5.1.4.2. Dano Metabólico

O resultado da descompensação metabólica pós exposição a ruído inclui disrupção dos estereocílios, edema do núcleo, edema de mitocôndrias, formação de vesículas citoplasmáticas e vacuolização.³

Exposição a ruído pode causar a constrição de vasos sanguíneos cocleares e desordens no metabolismo celular, que gerariam grandes quantidades de radicais livres como espécies oxidativas de oxigênio. Vasodilatação na orelha interna também pode gerar radicais livres devido a lesão de reperfusão. Radicais livres podem atacar o DNA, causando mutação nos genes e desnaturação proteica e também induzir a expressão de genes apoptóticos.¹

Glutamato é o neurotransmissor excitatório que atua nas sinapses das CCIs com o nervo coclear. Altos níveis de glutamato podem superestimular células pós sinápticas e causar edema dos corpos neuronais e dendritos, processo referido como excitotoxicidade.³

O nível de enzimas antioxidantes, como a glutathione, pode aumentar na cóclea depois de exposição a ruído, o que tem efeito protetor.¹

5.1.4.3. Sobrecarga de Cálcio

Exposição a ruído pode aumentar o número de canais de cálcio abertos, levando a um influxo de cálcio às células ciliadas. O excesso de cálcio leva a um aumento nas espécies reativas de oxigênio, rotas apoptóticas independentes. Uma alta concentração de cálcio nas células pode ativar as calpaínas, que decompõem as proteínas do citoesqueleto e hidrolisam proteínas como receptores hormonais.¹

5.1.4.4. Dano Imune e Inflamatório

Depois do ruído, as reações imunes e inflamatórias na cóclea ocorrem em 1 a 2 dias, com pico em 3 a 7 dias, depois desaparecem lentamente.¹

5.1.4.5. Fatores Genéticos

Depois de uma mesma exposição a ruído, alguns indivíduos desenvolvem uma perda auditiva substancial, enquanto outros experienciam efeito algum na sua audição. É estimado em aproximadamente 36% a herdabilidade da PAIR.⁶ Já foi demonstrado haver susceptibilidade genética a ruído frequência específica na cóclea (tonotópicas) e identificados os loci específicos para a susceptibilidade a PAIR.⁶ A expressão do gene *Nox3* é um fator de proteção contra o dano auditivo causado pelo ruído na frequência de 8 kHz em camundongos. Há fortes evidências de que as enzimas NOX tem um papel em limitar a resposta inflamatória. Este mecanismo anti-inflamatório é crucial para proteger a cóclea

contra a injúria pelo ruído, evitando o dano causado pelas espécies reativas de oxigênio.⁶

Uma ampla variabilidade interpessoal é observada após exposição entre 90 e 130 dB NPS ao longo de maiores períodos de tempo, condição típica de dano metabólico. Suscetibilidade a perda auditiva permanente induzida pelo ruído pode ser reduzida por exposição prévia a ruído não traumático o que é chamado de condicionamento.²

5.1.5. Aspectos Clínicos e História Natural

A sensibilidade de cada indivíduo é diferente. Pessoas de um grupo expostas ao mesmo ruído apresentaram resultados diferentes de comprometimento auditivo. Aspectos genéticos podem se sobrepor ao ruído e acelerar o desenvolvimento de PAIR ou ser um fator de proteção.

Pessoas mais velhas e indivíduos que já sofrem de perda auditiva sensorineural são mais suscetíveis ao ruído. Homens e mulheres aparentemente respondem igual ao ruído, porém indivíduos do sexo masculino tem comportamentos que os expõem mais ao ruído.¹

O principal sintomas de PAIR é perda auditiva progressiva. Outros sintomas crônicos e severos como zumbido, podem afetar seriamente a qualidade de vida. Quando o dano acomete frequências de fala (500 a 2.000 Hz), os indivíduos com PAIR passam a ter dificuldade de discriminação de fala, principalmente em ambientes ruidosos.²

A prevalência de zumbido em trabalhadores expostos ao ruído (24%) é superior à da população em geral (14%). A severidade do zumbido está associada com o grau da PAIR.³

Há evidências de deficiência vestibular relaciona a exposição a ruído, dano ao sáculo e às células ciliadas vestibulares.³

O comprometimento auditivo dificulta que os pacientes recebam informação sonora, eles podem passar a sentirem-se isolados e deprimidos. As habilidades de fala passam a se progressivamente afetadas também.

Trauma acústico pode resultar em dois tipos de injúria à orelha interna, dependendo da intensidade e da duração da exposição.

Exposição transiente e moderada a ruído pode levar a alteração transitória dos limiares auditivos e a audição pode recuperar-se após algumas horas ou dias.¹ A audição normalmente recupera dentro de 24 a 48h.³ A recuperação após uma elevação transitória dos limiares, provavelmente é um resultado de um desacoplamento reversível dos estereocílios das CCE da membrana tectórica

e/ou um aumento do ganho central reversível, associado a zumbido e a hiperacusia.³ Se o indivíduo persistir com a exposição ao ruído danoso poderá evoluir para perda auditiva permanente.¹

Altas frequências são comumente mais suscetíveis ao ruído.¹

5.1.6. Critérios Diagnósticos

A medida clássica e funcional da PAIR é a audiometria tonal, com a aferição do nível da menor pressão sonora para cada frequência testada que gera uma percepção auditiva.⁵ O audiograma é o exame padrão ouro para aferir a audição, ele identifica os limiares auditivos e é uma métrica sensível para detectar dano às células ciliadas cocleares, apesar de ser um pobre indicador de lesão às fibras do nervo coclear.⁷

Em animais se utiliza uma medida objetiva para estimar os limiares auditivo. O BERA é realizado com inserção de agulhas no subcutâneo e em resposta aos estímulos sonoros em frequências específicas, identificada a resposta eletrofisiológica da atividade somada das fibras do nervo coclear. O nível mínimo de pressão sonora necessário para gerar uma resposta elétrica é o limiar auditivo.⁵

Na fase inicial da PAIR há o achado do entalhe em 4 kHz na auditometria.¹

A severidade da PAIR seria de leve a moderada e simétrica baseada em audiogramas de tom puro.³

5.1.7. Exames

5.1.7.1 Audiometria Tonal

PAIR leve a moderada usualmente se apresenta com o clássico entalhe em 4kHz com alargamento para as frequências vizinhas de 3 a 6 kHz e com alguma recuperação em 8 kHz. O fato de algumas frequências próximas a 4kHz serem mais afetadas é devido a frequência de ressonância da orelha externa e conduto auditivo externo, como de propriedades mecânicas da orelha média.³

É esperado que na PAIR a perda neurossensorial (PNS) não seja superior a 75dB, apesar de que exposição crônica a ruído em alguns indivíduos pode levar a PNS profunda.³

5.1.7.2 Reconhecimento de Fala

PAIR está associada com uma redução nos escores de reconhecimento de fala em ambientes silenciosos, assim como, em ambientes ruidoso, mesmo com uma audiometria tonal normal, provavelmente devido a sinaptopatia e a redução das habilidades de processamento temporal como um resultado do dano às conexões entre CCI e fibras do nervo auditivo de baixas taxas de descargas espontâneas.³

5.1.7.3 Emissões Otoacústicas (EOA)

Alguns estudos apontam para a redução na amplitude das EOA em um estágio pré-clínico, para a detecção de PAIR em um estágio precoce, antes de alterações na audiometria, porém mais estudo são necessário para estabelecer com sucesso o uso de EOA para diagnóstico de PAIR.³

5.1.7.4 Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico

Há evidências de que a resposta da onda I do BERA reduza após exposição a ruído em animais com limiares auditivos normais, nas frequências tonotópicas relacionadas a perda sinápticas.³

A amplitude das ondas do BERA aumenta em proporção ao número de fibras do nervo coclear que recebe uma conexão viável com CCI.⁷

Há uma associação significativa da redução da amplitude da onda I com o relato de exposição a ruído. Outra estratégia é a aferição da latência da onda V com uso de ruído de mascaramento. O efeito do mascaramento na latência da onda V aparentemente correlaciona-se com alterações na amplitude da onda I.⁸

5.1.7.5 Eletrococleografia

Grupo de risco para PAIR teve uma média de SP (Potencial de somação pré-sináptico)/AP (potencial de ação) próxima ao dobro da do grupo de baixo risco para PAIR.⁹

5.1.8. Perda Auditiva Silenciosa

Algumas pessoas não têm perda auditiva diagnosticada, mas percebem dificuldade para ouvir claramente em ambientes ruidosos. A acuidade auditiva e a discriminação de fala destas pessoas é normal no audiograma.¹

Nos estágios iniciais, o ruído pode causar alterações transitórias nos botões sinápticos entre as células ciliadas internas e os neurônios do gânglio espiral. O número e a qualidade das sinapses são reduzidos significativamente após a exposição a ruídos. Apesar dos limiares auditivos retornarem ao normal após um período da exposição ao ruído, as sinapses não se recuperam totalmente. O zumbido e a hiperaúscia são alterações perceptuais que se desenvolvem destas lesões.¹

Mesmo quando há recuperação dos limiares após uma exposição a ruído pode haver dano aos botões sinápticos e ocorrer uma degeneração chamada sinaptopatia. Sinaptopatia resulta em perda das conexões entre células ciliadas internas e seus neurônios aferentes, como um resultado do dano pela excitotoxicidade pelo glutamato aos terminais pós sinápticos.³

As conexões sinápticas periféricas são os elementos mais vulneráveis na cóclea após superexposição acústica.¹⁰ As conexões sinápticas cocleares podem ser destruídas mesmo quando as CCIs sobrevivem. Apesar da alteração nos limiares ser uma métrica sensível do dano celular, é um método pouco sensível para detectar a perda difusa de sinapses das CCIs com o nervo coclear. Detecção comportamental de alteração nos limiares auditivos para tons puros, são minimamente alteradas quando a perda neural excede 80 a 90% das sinapses. Portanto, pode haver uma sinaptopatia difusa na cóclea com CCIs intactas e um audiograma normal.¹¹

A perda auditiva silenciosa não afeta significativamente a habilidade de detectar a presença de som, mas sim a habilidade de compreender a fala e provavelmente corrobora significativamente a clássica queixa do “eu ouço as pessoas falarem, mas não compreendo o que estão dizendo”.⁷

5.1.9. Prevenção

Como não há regeneração das células ciliadas cocleares, a PAIR não pode ser curada e medidas preventivas devem ser enfatizadas. As pessoas devem ficar afastadas de ambientes ruidosos e ouvir música alta em fones de ouvido o menor tempo possível.

Nas fábricas, o nível do ruído deve ser monitorado e os trabalhadores protegidos usando plugs e abafadores.

Pessoas com perda auditiva sensorineural devem evitar exposição a ruído excessivo.

O risco de PAIR pode ser minimizado se a exposição a ruído é reduzida abaixo de 80dB.

5.1.10. Tratamento

Opções terapêuticas potenciais seriam antioxidantes exógenos, antagonistas do cálcio e corticoides, que poderiam reduzir o impacto sonoro por diferentes vias. Como a patogênese da PAIR é complexa e as células ciliadas humanas não se regeneram, o tratamento da PAIR é muito difícil e diversas estratégias devem ser combinadas.¹

A administração de corticoide sistêmico e intratimpânico resulta em melhores desfechos auditivos após trauma acústico. Apesar das evidências de efeito protetor do corticoide, está não seria uma opção para exposição a ruído ocupacional crônica considerando os efeitos colaterais negativos do uso prolongado de corticosteroides.³

Antioxidantes podem ser uma alternativa mais segura. Já foi descrito em animais os efeitos protetores da N acetilcisteína, mas ainda não temos dados para humanos. Outros antioxidantes com potencial efeito protetor seriam: ginseng, coenzima Q10, vitamina A, vitamina C, vitamina E e vitamina B12, todos sem evidência consistentes de resultados.³

Neurotrofinas podem oferecer efeito protetor contra trauma sonoro, por serem importantes para formação e manutenção dos botões sinápticos das células ciliadas.³

Atualmente, pessoas que sofrem de surdez severa devido a PAIR podem ser tratadas com aparelhos de amplificação sonora individual ou implante coclear.¹

Uma perspectiva futura, é agir sobre a sinaptopatia coclear. Na cóclea dos mamíferos as CCI e os neurônios não são regenerados. Teoricamente, o reparo nas sinapses seria uma terapêutica viável, pois há uma janela terapêutica na qual as CCI e os neurônios do gânglio espiral sobrevivem. Estudos em animais demonstraram que o tratamento com neurotrofinas pode proporcionar a extensão neuronal e reparar o dano sináptico.¹²

5.2. *Hybrid mouse diversity panel (HMDP)*¹³

Estudos de associação do genoma (*genome-wide associations studies* – GWAS) forneceram as primeiras visões genéticas sem vieses de doenças prevalentes complexas, como doença arterial coronariana, diabetes e câncer. Muitos *loci* contêm genes ainda não identificados, e ainda não relacionados a doenças que possam ter associação, indicando um grande potencial para descobrir novas rotas e novas terapias alvo para intervenção. Para simplificar a análise genética, variações relevantes a doenças foram estudadas em camundongos.

O *HMDP* consiste em uma população de mais de 100 linhagens de camundongos selecionadas para análises de traços genéticos complexos. O objetivo de selecionar as linhagens é aumentar a resolução do mapeamento genético e disponibilizar um repositório que permitisse a integração e cruzamento de dados genômicos, transcriptômicos, metabolômicos, proteômicos e de fenótipos clínicos.

Para aumentar o poder, o número de linhagens é expandido por disponibilizar linhagens consanguíneas e recombinantes.

O *HMPD* é muito conveniente para análises genéticas de fatores ambientais, pois os camundongos do mesmo genótipo podem ser examinados sobre diferentes condições, assim como, camundongos de diferentes genótipos podem ser mantidos em um ambiente controlado e submetidos a uma mesma intervenção para se observar os diferentes desfechos. Claramente, estudos em camundongos, nos quais o acesso a tecidos e o controle às condições ambientais pode ser padronizado simplifica as análises genéticas.

Referências Bibliográficas:

1. Ding T, Yan A, Liu K. What is noise-induced hearing loss? *Br J Hosp Med*. 2019;80(9):525-529. doi:10.12968/hmed.2019.80.9.525
2. Konings A, Laer LV, Camp GV. Genetic Studies on Noise-Induced Hearing Loss: A Review: *Ear Hear*. 2009;30(2):151-159. doi:10.1097/AUD.0b013e3181987080
3. Le TN, Straatman LV, Lea J, Westerberg B. Current insights in noiseinduced hearing loss: a literature review of the underlying mechanism, pathophysiology, asymmetry, and management options. *J*

Otolaryngol - Head Neck Surg. 2017;46(1):41. doi:10.1186/s40463-017-0219-x

4. Imam L, Hannan SA. Noise-induced hearing loss: a modern epidemic? *Br J Hosp Med.* 2017;78(5):286-290. doi:10.12968/hmed.2017.78.5.286
5. Liberman MC. Noise-Induced Hearing Loss: Permanent Versus Temporary Threshold Shifts and the Effects of Hair Cell Versus Neuronal Degeneration. In: Popper AN, Hawkins A, eds. *The Effects of Noise on Aquatic Life II*. Vol 875. Springer New York; 2016:1-7. doi:10.1007/978-1-4939-2981-8_1
6. Lavinsky J, Crow AL, Pan C, et al. Genome-Wide Association Study Identifies Nox3 as a Critical Gene for Susceptibility to Noise-Induced Hearing Loss. Avraham KB, ed. *PLOS Genet.* 2015;11(4):e1005094. doi:10.1371/journal.pgen.1005094
7. Liberman MC. Hidden Hearing Loss. *Sci Am.* 2015;313(2):48-53. doi:10.1038/scientificamerican0815-48
8. Kobel M, Le Prell CG, Liu J, Hawks JW, Bao J. Noise-induced cochlear synaptopathy: Past findings and future studies. *Hear Res.* 2017;349:148-154. doi:10.1016/j.heares.2016.12.008
9. Liberman MC, Epstein MJ, Cleveland SS, Wang H, Maison SF. Toward a Differential Diagnosis of Hidden Hearing Loss in Humans. Malmierca MS, ed. *PLOS ONE.* 2016;11(9):e0162726. doi:10.1371/journal.pone.0162726
10. Kujawa SG, Liberman MC. Translating animal models to human therapeutics in noise-induced and age-related hearing loss. *Hear Res.* 2019;377:44-52. doi:10.1016/j.heares.2019.03.003
11. Liberman MC, Kujawa SG. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear Res.* 2017;349:138-147. doi:10.1016/j.heares.2017.01.003
12. Liberman MC. Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. *F1000Research.* 2017;6:927. doi:10.12688/f1000research.11310.1
13. Ghazalpour A, Rau CD, Farber CR, et al. Hybrid mouse diversity panel: a panel of inbred mouse strains suitable for analysis of complex genetic traits. *Mamm Genome.* 2012;23(9-10):680-692. doi:10.1007/s00335-012-9411-5

6. OBJETIVO

6.1. Objetivo Geral

Determinar a função sináptica coclear de 69 linhagens de camundongos

6.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a amplitude basal da onda I do BERA em camundongos e a sua variação após exposição a ruídos
- Demonstrar a influência genética na variabilidade da perda auditiva induzida pelo ruído

9. ARTIGO 2

JARO (2020)
DOI: 10.1007/s10162-020-00762-3
© 2020 Association for Research in Otolaryngology



Research Article

The Genetics of Variation of the Wave 1 Amplitude of the Mouse Auditory Brainstem Response

ELY CHEIKH BOUSSATY,¹ DANIELLE GILLARD,¹ JOEL LAVINSKY,² PEZHMAN SALEHI,³ JUEMEI WANG,⁴
ALINE MENDONÇA,² HOOMAN ALLAYEE,⁵ URI MANOR,⁶ AND RICK ADAM FRIEDMAN⁷

¹Department of Surgery, Division of Otolaryngology, University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive, Mail Code 0666, La Jolla, CA 92093, USA

²Federal University of Rio Grande do Sul, Sarmento Leite Street, 500 -, Porto Alegre, 90035-190, Brazil

³Northeast Ohio Medical University, 4209 OH-44, Rootstown, OH 44272, USA

⁴University of Southern California, 1501 San Pablo St, Los Angeles, CA 90033, USA

⁵University of Southern California, 1975 Zonal Ave, Los Angeles, CA 90033, USA

⁶Waitt Advanced Biophotonics Core, Salk Institute for Biological Studies, 10010 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037, USA

⁷University of California, San Diego, 9444 Medical Center Drive, Mail Code 0768 -, La Jolla, CA 92037, USA

Received: 9 September 2019; Accepted: 19 July 2020

ABSTRACT

This is the first genome-wide association study with the Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP) to define the genetic landscape of the variation in the suprathreshold wave 1 amplitude of the auditory brainstem response (ABR) both pre- and post-noise exposure. This measure is correlated with the density of the auditory neurons (AN) and/or the complement of synaptic ribbons within the inner hair cells of the mouse cochlea. We analyzed suprathreshold ABR for 635 mice from 102 HMDP strains pre- and post-noise exposure (108 dB 10 kHz octave band noise exposure for 2 h) using auditory brainstem response (ABR) wave 1 suprathreshold amplitudes as part of a large survey (Myint et al., *Hear Res* 332:113–120, 2016). Genome-wide significance levels for pre- and post-exposure wave 1 amplitude across the HMDP were performed using FaST-LMM. Synaptic ribbon counts (Ctbp2 and mGluR2) were analyzed for the extreme strains within the HMDP. ABR wave 1 amplitude varied across all strains of the HMDP with differences ranging between 2.42 and 3.82-fold pre-exposure and between 2.43 and 7.5-fold post-exposure with several tone burst stimuli (4 kHz, 8 kHz, 12 kHz, 16 kHz, 24 kHz, and 32 kHz). Immunolabeling of paired synaptic ribbons and glutamate

receptors of strains with the highest and lowest wave 1 values pre- and post-exposure revealed significant differences in functional synaptic ribbon counts. Genome-wide association analysis identified genome-wide significant threshold associations on chromosome 3 (24 kHz; JAX00105429; $p < 1.12E-06$) and chromosome 16 (16 kHz; JAX00424604; $p < 9.02E-07$) prior to noise exposure and significant associations on chromosomes 2 (32 kHz; JAX00497967; $p < 3.68E-08$) and 13 (8 kHz; JAX00049416; $1.07E-06$) after noise exposure. In order to prioritize candidate genes, we generated *cis*-eQTLs from microarray profiling of RNA isolated from whole cochleae in 64 of the tested strains.

This is the first report of a genome-wide association analysis, controlled for population structure, to explore the genetic landscape of suprathreshold wave 1 amplitude measurements of the mouse ABR. We have defined two genomic regions associated with wave 1 amplitude variation prior to noise exposure and an additional two associated with variation after noise exposure.

Keywords: GWAS, HMDP, NIHL, eQTL

INTRODUCTION

The sensation of hearing is the result of mechanical impulses (sound waves) being transmitted through

Correspondence to: Rick Adam Friedman · University of California, San Diego · 9444 Medical Center Drive, Mail Code 0768 -, La Jolla, CA 92037, USA. email: rafriedman@health.ucsd.edu

the fluid-filled cochlea and coded into neural impulses that travel along the auditory nerve cranial through the brainstem to higher association centers within the cerebral cortex. Each auditory nerve fiber (ANF) contacts a single inner hair cell within the organ of Corti (Eybalin 1993). There is increasing evidence that the ability to hear and understand as we age, in a variety of environments, is dictated by the neural connectivity of the inner hair cells within the cochlea and their contacts with ANFs. Recent data in both mice and humans suggests there exists a “hidden hearing loss” resulting from synaptopathy between inner hair cells (IHCs) and type-I ANFs (Liberman 2017). Disruption of these synapses not only leads to denervation but also a slow degeneration of spiral ganglion neurons (Shi et al. 2016). In humans, this phenomenon has been linked to difficulty understanding speech in complex sound environments (Liberman and Kujawa 2017).

While there are few practical ways of identifying these types of losses in the clinical setting, there is evidence in mice that cochlear synaptopathy can be captured by the amplitude of the first wave (wave I) of the auditory brainstem response (ABR) after a suprathreshold stimulus (Kujawa and Liberman 2015). In several experiments, noise exposure led to a convincing permanent decline in the suprathreshold ABR wave I amplitude despite recovery of otoacoustic emissions and ABR thresholds. It has been determined that the wave I amplitude correlates strongly with the integrity of auditory synapses and/or the complement ANFs (Kobel et al. 2017).

Recently, evidence for this “hidden hearing loss” has been demonstrated in human temporal bone specimens. (Liberman et al. 2016). It appears that noise exposure over time results in synaptic ribbon loss. In addition, age-related hearing loss (ARHL) has been shown to result from loss of sensory cells and neurons (Schuknecht 1964). It has been shown in mice that ARHL results from a similar synaptic loss between IHCs and ANFs and this cochlear synaptopathy also precedes hair cell loss and permanent threshold shifts in the aging mouse ear (Sergeyenko et al. 2013).

Our laboratory has recently described baseline and noise-induced threshold shifts in 100 strains of the Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP) (Myint et al. 2016) and, with these data, we have begun to define the genetic landscape of these complex traits (Crow et al. 2015) (Lavinsky et al. 2016). The HMDP is a collection of classical inbred (CI) and recombinant inbred (RI) strains whose genomes have been sequenced and/or genotyped at high resolution. In this manuscript we have begun to explore the genetic landscape of cochlear synaptopathy and determine candidate loci and genes. Herein we report the first characterization of suprathreshold wave 1 amplitude of the mouse ABR in over 100 mouse strains and perform the first genome-wide association study (GWAS) in mice corrected for population structure both before and after noise exposure.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

The Institutional Care and Use Committee (IACUC) at University of California San Diego (IACUC 17178) and University of Southern California (IACUC 12033) endorsed the animal protocol for the Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP) inbred strains. Strains and genotypes are accessible from the Jackson Laboratories (www.jax.org). All results required to corroborate the conclusions presented here are provided entirely within this article.

Hybrid Mouse Diversity Panel Strains and Genotypes

The HMDP is a collection of common inbred strains composed of 30 classical inbred strains (CI) providing genetic resolution and allelic diversity, and more than 70 recombinant inbred strains (RI) that enhance resolution and increase power (Bennett et al. 2010). Five-week-old female mice (n = 635) from 102 Hybrid Mouse Diversity Panel strains (n = 6–7/strain) were purchased from the Jackson Laboratories. A detailed characterization of the HMDP is provided in Bennett et al. (2010). Mice were aged until 5 weeks and accommodated in sterilized cages with autoclaved food and water with an average daily ambient noise level of 40 dB. The phenotypes in the HMDP strains were managed using genotypes of 500,000 single nucleotide polymorphisms (SNPs) obtained from the Mouse Diversity Array (minor allele frequencies 9.5%; missing genotype frequencies 10%) (Van Nas et al. 2010).

ABR Wave 1 P1-N1 Values for Wave 1 Suprathreshold Amplitude Calculations

In order to analyze pre- and post-noise exposure ABR wave 1 P1-N1 measurements, stainless steel electrodes were placed subcutaneously at the vertex of the head and the right mastoid, with a ground electrode at the base of the tail. Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg body wt) and xylazine (16 mg/kg body wt). Mouse body temperature was maintained through the use of a TCAT-2DF temperature controller and the HP-4 M heating plate (Physitemp Instruments Inc., Clifton,

NJ). Artificial tear ointment was applied to the eyes and each mouse was recovered on a heating pad.

Test sounds were presented using a (Intelligent Hearing Systems) speaker attached to an 8-in. long tube that was inserted into the ear canal. Auditory signals were presented as tone pips with a rise and a fall time of 0.5 msec and a total duration of 5 msec at the frequencies 4, 8, 12, 16, 24, and 32 kHz. Tone pips were delivered below threshold and then increased in 5 dB increments until a maximum of 100 dB was reached. Signals were presented at a rate of 30/s. Responses were filtered with a 0.3–3 kHz pass-band ($\times 10,000$ times). For each stimulus intensity 512 waveforms were averaged. Data was stored for offline analysis of ABR peak-to-peak (P1-N1) values for wave 1 amplitudes at 80 dB SPL. Post-exposure thresholds were evaluated by the same method 2 weeks post-exposure.

All hearing tests were performed in a separate (MAC-1 soundproof) chamber in order to eliminate both environmental and electrical noise. An acquisition board (National Instruments Corporation, Austin, TX) was regulated by custom software used to generate the stimuli and to measure the responses. Stimuli were provided by a custom acoustic system (two miniature speakers, and sound pressure was measured by a condenser microphone).

Noise Exposure Protocol

Using a method adapted from Kujawa and Liberman (2009) 6-week-old mice were exposed for 2 h to 10 kHz octave band noise (OBN) at 108 dB SPL. The noise exposure protocol was previously described by White et al. (2009). The cage was arranged in a soundproof chamber (MAC-1) created by Industrial Acoustics (IAC, Bronx, NY) and the sound chamber was lined with soundproofing acoustical foam. Noise recordings were performed with a speaker (Fostex FT17H Tweeter) constructed into the top of the sound chamber. Calibration of the deleterious noise was done with a B&K sound level meter with a variation (1.5 dB) over the cage. For 2 h, mice were positioned in a circular exposure cage with 4 shaped compartments and were capable to move about within the compartment. ABR testing involved the right ear only.

Data Analysis

We performed the association analysis using FaST-LMM (factored spectrally transformed linear mixed model), a method accounts for population structure (<https://www.microsoft.com/en-us/download/details.aspx?id=52559> Version 2.0.7 downloaded October 2017). This method set SNPs according to their

linear regression p values and then constructs kinship matrices using the SNPs from all other chromosomes to improve power when testing all SNPs on a specific chromosome (Lippert et al. 2011). This procedure includes the SNP being tested for association in the regression equation only once.

Genome-wide significance threshold in the HMDP was determined by the family-wise error rate (FWER) as the probability of observing one or more false positives across all SNPs per phenotype. We performed 100 different sets of permutation tests and parametric bootstrapping of size 1000 and observed that the genome-wide significance threshold at a FWER of 0.05 corresponded to $p = 4.1 \times 10^{-6}$, similar to that used in previous studies with the HMDP (Bennett et al. 2010). This is approximately an order of magnitude larger than the threshold obtained by Bonferroni correction (4.6×10^{-7}), which would be an overly conservative estimate of significance because nearby SNPs among inbred mouse strains are highly correlated with each other.

In order to prioritize candidate genes, we used EMMA (Efficient Mixed-Model Association) to perform an association between all SNPs and array probes mapping within each region. EMMA is a statistical test for association mapping correcting for population structure (Kang et al. 2008). An R package implementation of EMMA (version 1.1.2) is available online at www.mouse.cs.ucla.edu/emma.

GWAS Candidate Genes

RefSeq genes were downloaded from the UCSC genome browser (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=mm10>) using the GRCm38/mm10 genome assembly to characterize genes located within each association. The 95 % confidence interval for the distribution of distances between the most significant and the true causal SNPs, for simulated associations that explain 5 % of the variance in the HMDP, is 2.6 Mb (Bennett et al. 2010). Only SNPs mapping to each associated region were used in this analysis. We selected SNPs that were variants in at least one of the HMDP CI strains.

Cochlear Whole Mount Immunolabeling

We used immunolabeling of synaptic ribbons and glutamate receptors to quantify the functional synapses in strains with the highest and lowest suprathreshold wave 1 amplitudes pre- and post-noise exposure. Animals were euthanized and intracardially perfused after the second hearing measurement and their cochleae were post-fixed with 4 % PFA for 1 h. Fixed samples were rinsed extensively in phosphate-buffered saline (PBS) and dissected under

a microscope to three half turns and permeabilized in 1 % Triton X-100 solution for 15 min at room temperature. The specimens were washed three times with PBS and blocked with 10 % goat serum for 1 h at room temperature. Tissues were incubated at 37 °C overnight with the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-carboxyl-terminal binding protein 2 (CtBP2) IgG1 at 1:200 (612044; BD Biosciences), monoclonal mouse anti-GluR2 IgG2a at 1:1000 (MAB397; Millipore) and polyclonal rabbit anti-myosin VIIa at 1:200 (25-6790; Proteus Biosciences). The following day, after three 15-min PBS washes, the tissues were incubated with the appropriate Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 633-conjugated secondary antibodies at a concentration of 1:1000 for 1 h in darkness at room temperature. Following the final washes after secondary incubations, samples were mounted on slides using ProLong Glass antifade mountant and left to dry for at least 24 h before image acquisition.

Frequency regions corresponding to 16 and 32 kHz were located through their distance from cochlear apex, based on the place-frequency map from Müller et al. (2005) and imaged with a 20×1.4 NA on a Zeiss 880 LSM airyscan confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). After acquisition, images were Airyscan processed and post-processed and analyzed using Imaris software (BITPLANE) to quantify the number of functional synapses. Briefly, the puncta corresponding to synaptic ribbons and glutamate receptors were reconstructed using the option of spots recognition and limited to cytoplasmic volume through Myo7a staining and a threshold level of 12 voxels to define the minimum size of objects selected was applied to all processed images and the spot colocalization option was number of paired synapses.

Gene Expression Data

Cochleae from each 6-week-old mice were isolated from the 64 HMDP strains (3 mice/strain). The inner ear was microdissected and the surrounding soft tissue and the vestibular labyrinth was removed. The dissected cochleae were then frozen in liquid nitrogen and ground to powder. RNA was extracted and purified by placing cochlea samples in RNA lysis buffer (Ambion). The sample was incubated overnight at 4 °C, centrifuged ($12,000\times g$ for 5 min) to pellet insoluble materials, and the RNA isolated following manufacturer's recommendations. This procedure generated 300 ng of total RNA per mouse.

Gene expression analysis was performed, and gene expression measurements were taken using Illumina's mouse whole genome expression kit, BeadChips. Amplifications and hybridizations were performed

according to Illumina's protocol (Southern California Genome Consortium microarray core laboratory at University of California, Los Angeles). RNA (100 ng) was reverse transcribed to cDNA using the Ambion cDNA synthesis kit (AMIL1791) and then converted to cRNA and labeled with biotin. Subsequently, 800 ng of biotinylated cRNA product was hybridized to prepare whole genome arrays and was incubated overnight (16–20 h) at 55 °C. Arrays were washed and then stained with Cy3-labeled streptavidin. Excess stain was removed by washing and then arrays were dried and scanned on an Illumina BeadScan confocal laser scanner.

Reagent and Data Availability

The authors state that all data necessary for confirming the conclusions presented in the article are represented fully within the article.

RESULTS

Baseline and Post-noise Exposure Phenotypic Variation Within the HMDP

We tested 5-week-old female mice ($n=635$) from 102 HMDP strains ($n=6-7$ /strain) at baseline and post-noise exposure using ABR and calculated wave 1 suprathreshold amplitudes (P1-N1) at 8, 12, 16, 24, and 32 kHz tone burst stimuli. A broad range of suprathreshold ABR wave 1 amplitudes were detected across the HMDP with differences between the lowest and the highest strains at specific ABR stimulus frequencies demonstrated Prior and after exposure to damaging noise levels.

Figure 1 characterizes the variation in ABR wave 1 amplitude at baseline in HMDP strains. Frequencies of 8, 12, 16, 24, and 32 kHz demonstrated differences of 3.82, 2.42, 2.62, 3.75, and 3.43-fold between highest and lowest strains respectively prior to noise (Fig. 1).

At the baseline, several wave 1 amplitude patterns were noticeable by looking to the highest and lowest deciles: three strains among the top ten (BXH20/KCej, BTBR T+tf/J and BALB/cByJ) exhibited higher wave 1 amplitude measurement across four consecutive or all frequencies. Other strains showed a particular strength in specific cochlear regions. For example, CXB9/HiAJ had preferentially high wave 1 amplitude values across low frequencies while BXH9/TyJ had stronger measurement at high frequencies. SJL/J and BXA7/PgnJ were more consistent at mid frequencies. A similar pattern was also seen among the worst performer decile, NOR/LtJ and AKR/J recorded lowest wave 1 amplitude across all frequencies. Other strains (BXD84/RwJ, 129S1/SVlmJ and A/J) had a particular low wave 1 amplitude value at

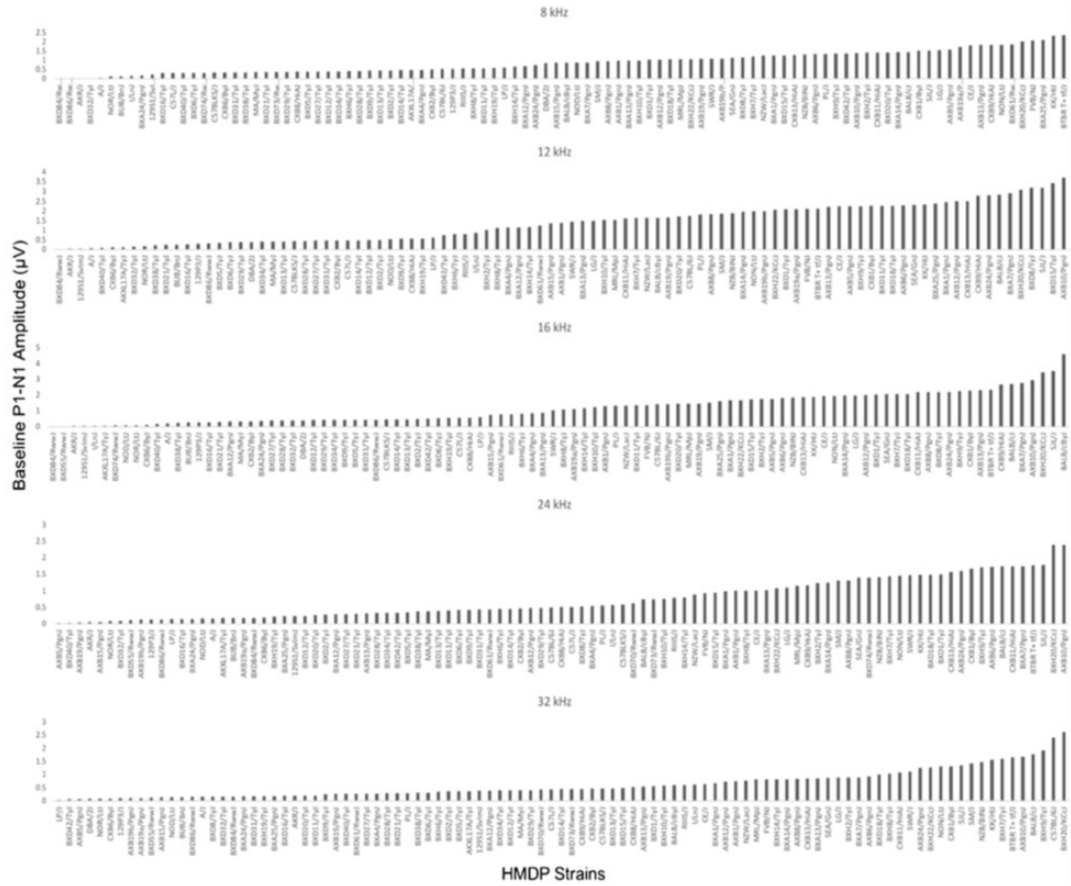


FIG. 1. Characterization of pre-exposure P1-N1 wave 1 amplitudes (at 80 dB SPL) in 102 HMDP inbred mouse strains

low frequencies while BXD55/RwJ and AXB19b/PgnJ were more affected at high frequencies.

The exposure to noise increased level of strain variation particularly at mid and high frequencies. Frequencies of 8, 12, 16, 24, and 32 kHz demonstrated differences of 3.75, 2.43, 3.23, 5.20, and 7.5-fold post-noise exposure (Fig. 2), respectively.

An analysis of the highest wave 1 amplitude decile after noise shows that six strains (NZB/BINJ, SJL/J, LJ/J, KK/Hij, BXD31/TyJ and AXB24/PgnJ) resisted the noise induced decrease in wave 1 amplitude. Another noticeable pattern was the low frequency specific strength in wave 1 amplitude value at BXA1/PgnJ and AXB13/PgnJ. A similar analysis for the lowest wave 1 amplitude deciles shows that four strains BXD84/RwJ, BXD55/RwJ, 129S1/SVImJ, and AXB19b/PgnJ preserved their lower wave 1 amplitude measurement across consecutive or all tested frequencies. This strain associated variation in suprathreshold

ABR amplitudes prior and post-exposure to noise support the hypothesis that this phenotype has a genetic basis.

Next, we wanted to explore the relationship between P1-N1 wave 1 amplitudes and their corresponding ABR thresholds in HMDP strains prior and after noise exposure. Scatter plots and Spearman correlation data from Fig. 3 show a small but significant inverse correlation between wave 1 amplitudes and ABR threshold across all tested frequencies prior and post-noise exposure. The degree of correlation increases from low to high frequencies and from pre- to post-noise exposure: 8 kHz frequency pre-noise, ($\rho = -0.353$, $p < 0.001$, Fig. 3a) vs 8 kHz post-noise ($\rho = -0.396$, $p < 0.001$, Fig. 3f). For 12 kHz frequency pre-noise, the Spearman's $\rho = -0.395$ ($p < 0.001$, Fig. 3b) vs ($\rho = 0.476$, $p < 0.001$, Fig. 3g) in post-noise exposure. The Spearman correlation for 16 kHz pre-noise ($\rho = -0.370$, $p < 0.001$, Fig. 3c) vs

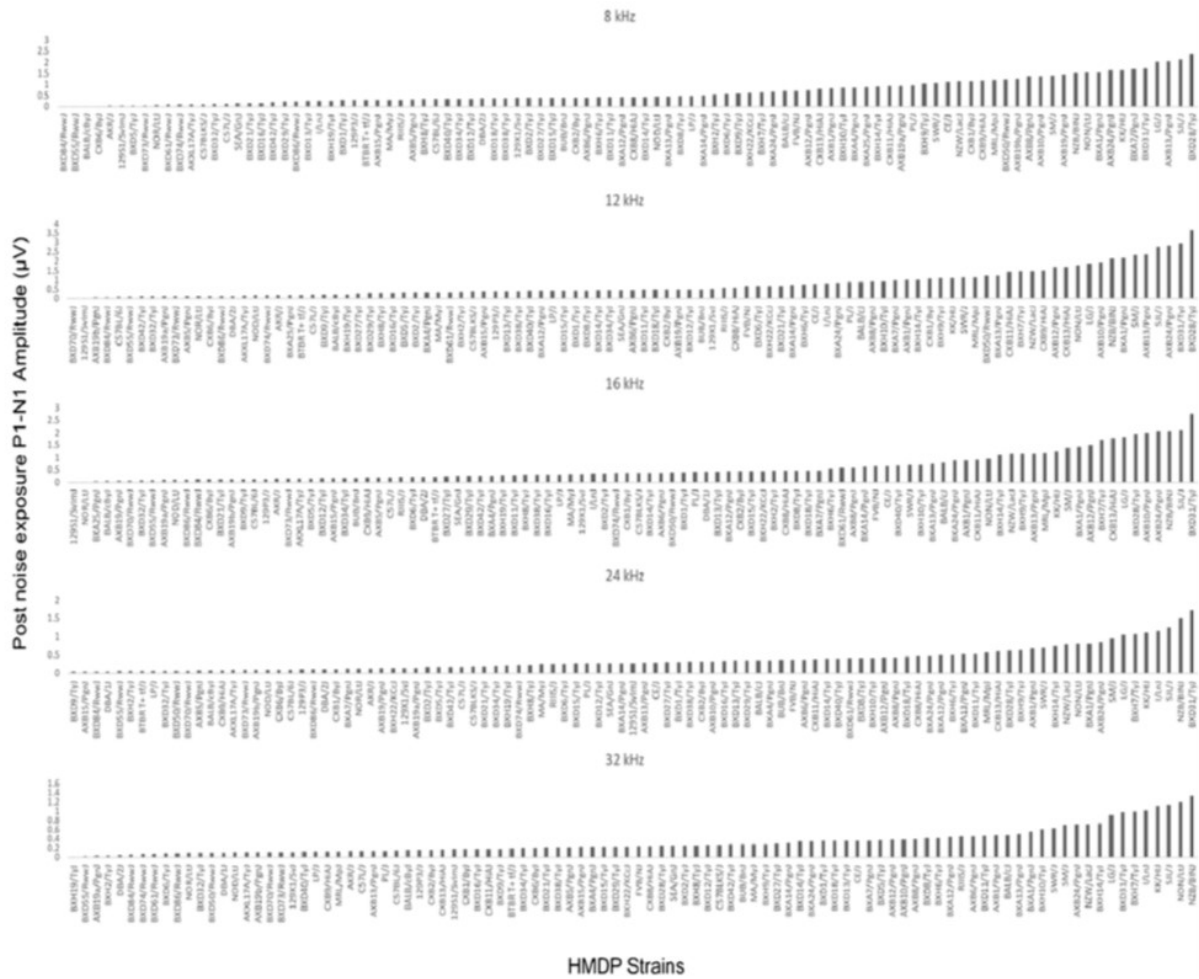


FIG. 2. Characterization of post-noise exposure P1-N1 wave 1 amplitudes (at 80 dB SPL) in 102 HMDP inbred mouse strains

($\rho = -0.541$, $p < 0.001$, Fig. 3h) for 16 kHz post-noise. Figure 3d shows ($\rho = -0.442$, $p < 0.001$) for 24 kHz pre-noise vs ($\rho = -0.496$, $p < 0.001$) for 24 kHz post-noise in Fig. 3i; while the highest Spearman's ρ correlation is attributed to 32 kHz pre-noise ($\rho = -0.570$, $p < 0.001$, Fig. 3e) and 32 kHz post-noise ($\rho = -0.562$, $p < 0.001$, Fig. 3j).

Variation in Wave 1 Amplitudes Correlates with Number of IHC Paired Synapses

To test the relation between suprathreshold wave 1 amplitudes and the number of functional synapses in the HMDP, we selected the strains with highest and lowest suprathreshold wave 1 amplitudes pre- (BALB/cByJ and BXD84/RwwJ respectively) and post-noise exposure (NZB/BINJ and BXD55/RwwJ respectively) for paired synapse quantification.

Figure 4b shows that the number synapses varied in conjunction with the corresponding wave 1 amplitude values. At the 16 kHz frequency pre-noise, the paired synapses mean for BALB/cByJ was 16.15 ± 1.17 per inner hair cell vs 13.59 ± 0.57 for BXD84/RwwJ ($p = 0.044$). The difference was higher in the post-noise comparison with the NZB/BINJ strain having a mean value of 8.428 ± 1.82 vs 3.908 ± 1.91 for BXD55/RwwJ ($p = 0.005$) demonstrating variation in the synapse and/or ANF sensitivity to a noise. Mean ABR representative waves (Fig. 4c) from the strains representing the lowest and the highest ABR wave 1 measurement prior and after noise exposure followed similar pattern to the synaptic count of these strains; the number of functional IHC synapses varied in conjunction with the corresponding wave 1 amplitude values. ABR threshold (Fig. 4d) corresponding of these 4 extreme strains inversely correlated with synapses count in these strains. Mean ABR representative waves

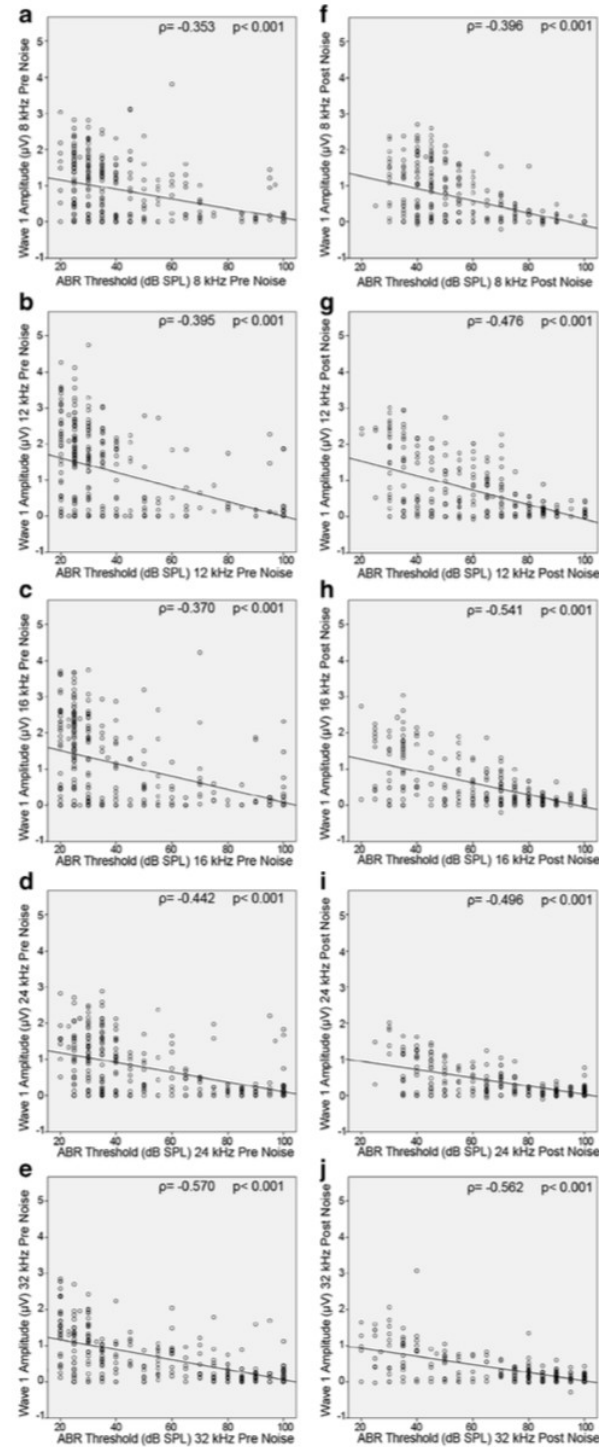


FIG. 3. Scatterplot and Spearman correlation between wave 1 amplitude and ABR threshold for individual mice pre- (left) and post- (right) noise across all tested frequencies. There is a consistent negative correlation between ABR threshold and wave 1 amplitude.

a 8 kHz pre-noise. b 12 kHz pre-noise. c 16 kHz pre-noise. d 24 kHz pre-noise. e 32 kHz pre-noise. f 8 kHz post-noise. g 12 kHz post-noise. h 16 kHz post-noise. i 24 kHz post-noise. j 32 kHz post-noise

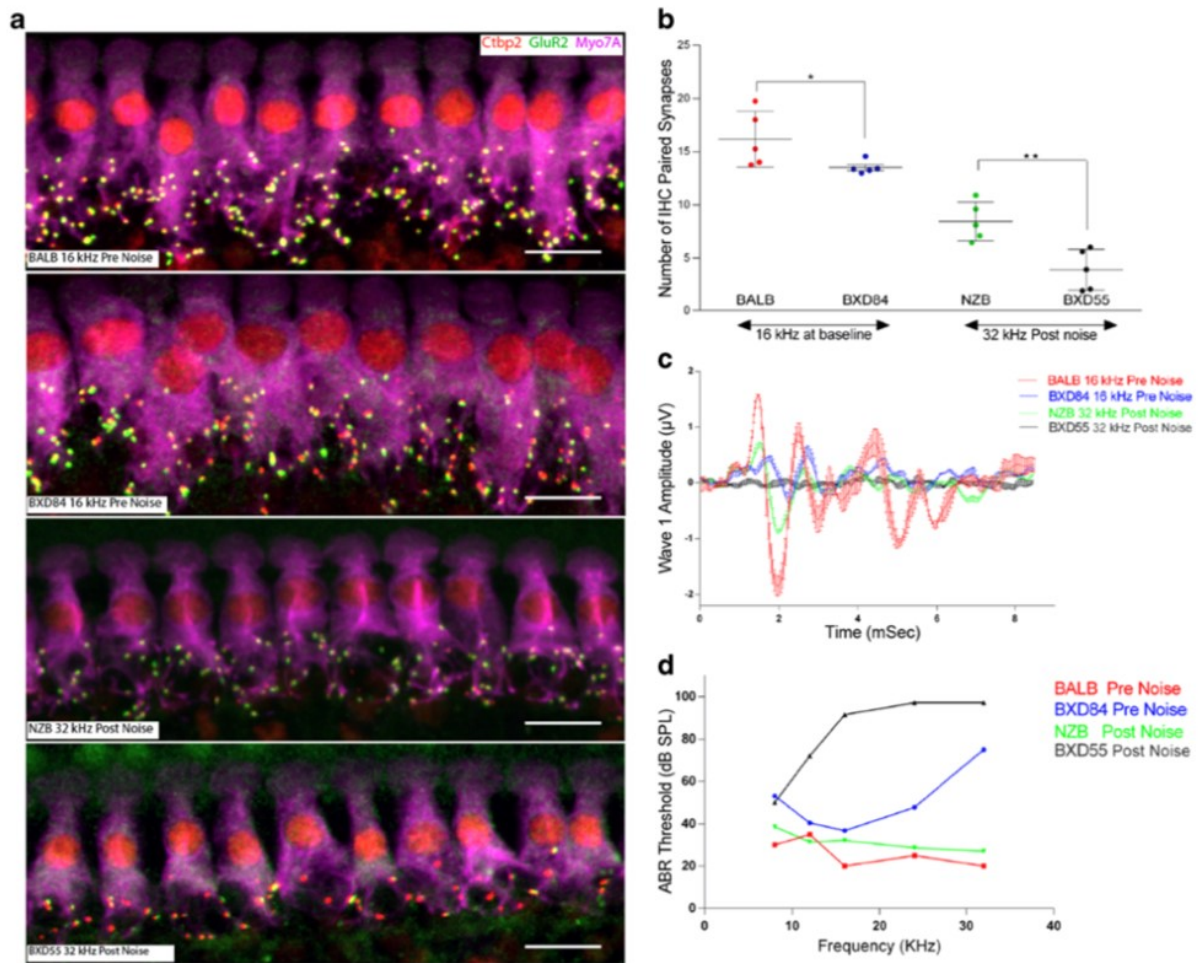


FIG. 4. **a** Representative images of synaptic immunolabeling for the 16 kHz cochlear region pre-noise of highest BALB/cByJ and lowest wave 1 BXD84/RwwJ and the 32 kHz frequency region for the highest and lowest wave 1 values post-noise exposure NZB/BINJ and BXD55/RwwJ respectively. $n=5$ for each strain. Scale bar 10 μm . **b** presents the quantification of paired synapses per IHC from the four

conditions presented in **a**. **c** Mean ABR trace recorded representing four extreme strains upon 80 dB sound pressure level $n=5$ for each strain. **d** ABR threshold (in dB SPL) plotted as a function of auditory stimulus frequency (in kHz) $n=5$ for each strain. All data presented as mean \pm SEM. The statistical tests were a priori selected independent samples t test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(Fig. 4c) from the strains representing the lowest and the highest ABR wave 1 measurement prior and after noise exposure followed similar pattern to the synaptic count of these strains; the number of functional IHC synapses varied in conjunction with the corresponding wave 1 amplitude values. ABR threshold (Fig. 4d) corresponding of these 4 extreme strains inversely correlated with synapses count in these strains.

GWAS for Suprathreshold ABR P1-N1 Variation at Each Tested Frequency

Association analysis was applied to the response to each tone pip stimulus separately to identify genetic

associations for the five tone-burst stimuli. We performed a GWAS for both pre- (Fig. 5 a and b) and post-noise exposure ABR P1-N1 suprathreshold (Fig. 5 c and d) in order to identify loci associated with the various frequencies tested. Association p values (adjusted) were calculated for 200,000 SNPs with minor allele frequency of $>5\%$ ($p < 0.05$ genome-wide equivalent for GWA using FaST-LMM in the HMDP is $p = 4.1 \times 10^{-6}$, $-\log_{10}P = 5.39$) as described above.

At the genome-wide significance threshold ($-\log P = 5.39$), associations on Chr. 3 and Chr. 16 were identified pre-noise exposure (Fig. 5) and on Chr. 2 and Chr. 13 post-noise exposure. The details of each association are provided in Table 1.

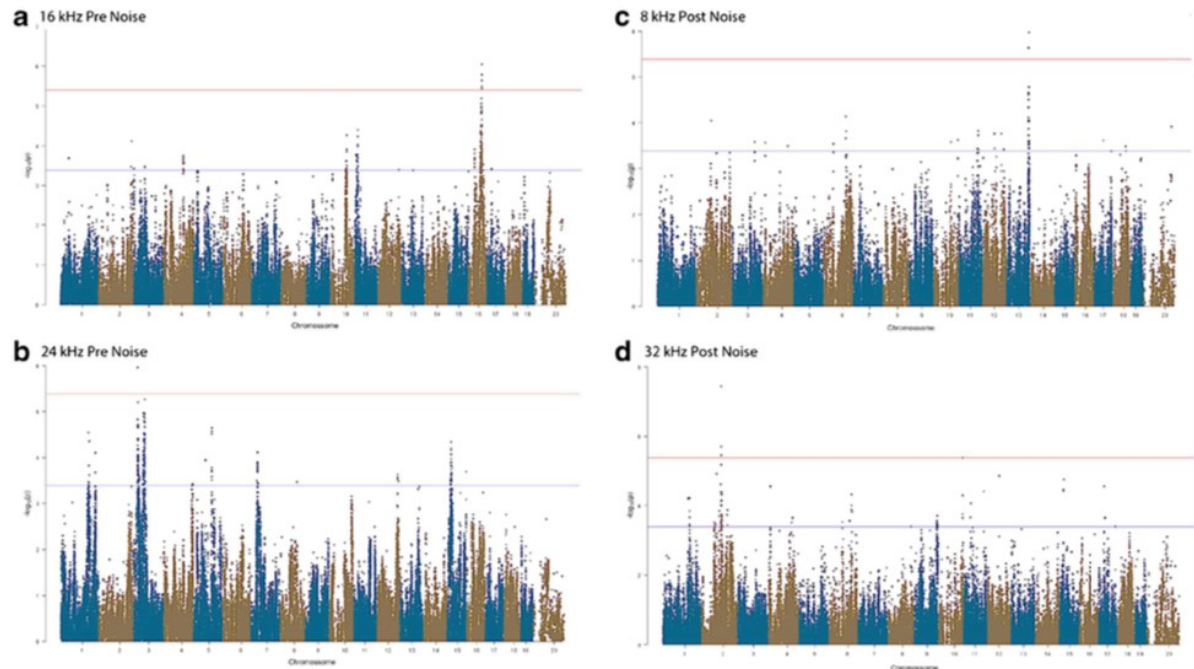


FIG. 5. GWAS results for ABR wave 1 P1-N1 suprathreshold amplitude in the HMDP. Manhattan plots showing the association ($-\log_{10} p$ values ($-\log P$) for 16 kHz (a) and 24 kHz (b) at pre-noise and 8 kHz (c) and 32 kHz (d) post-noise exposure in 102 HMDP mouse strains. The analysis was performed using ~200,000 SNPs

with a minor allele frequency > 5 %. Each chromosome is plotted on the x-axis in alternating brown and blue colors. SNPs on Chr. 16, Chr. 3, Chr. 13, and Chr. 2 exceeded the predetermined genome-wide significance threshold ($-\log P = 5.39$ red line)

Association Analysis

In order to characterize these 4 associated genomic regions, we defined 2.6 Mb as our interval (Table 1). Pre-noise exposure, ABR wave 1 P1-N1 associations exceeding the genome-wide significance threshold were identified on chromosome 3 (Fig. 6a) and 16 (Fig. 6b). For post-noise exposure, associations were significant on chromosome 13 (Fig. 6c) and chromosome 2 (Fig. 6d).

Exploring Candidate Genes

Quantitative variation in gene expression levels in a specific tissue can act as an intermediate phenotype

between genomic sequences variation and phenotypes to explain the remaining “hidden” heritable factors. The heritability of gene expression means it can be subject to the same quantitative trait loci (QTL) analyses as conventional trait data to reveal the so-called expression quantitative trait loci (eQTLs). Transcript abundance of each gene which will be the phenotype analyzed, can therefore be mapped to the genome using standard linkage methods, allowing identification of eQTLs loci that explains fractions of a gene expression phenotype.

Our cochlear expression data allowed us to analyze all 50 identified candidate genes at each association interval. Except the chromosome 16 locus, we identi-

TABLE 1

Genome-wide association results at baseline and post-noise exposure						
Trait ^a	Chr	SNP	Position (Mb) ^b	$-\log P$	No. of genes ^c	Human region (Chr: start Mb–end Mb)
16 kHz pre-Exposure	16	JAX00424604	73.0	9.02E-07	2	Chr3:77.5–79.8
24 kHz pre-exposure	3	JAX00105429	25.7	1.12E-06	11	Chr3:171.3–174.2
8 kHz post-exposure	13	JAX00049416	116.5	1.07E-06	23	Chr5:50.7–54.9
32 kHz post-exposure	2	JAX00497967	101.9	3.68E-08	14	Chr11:34.8–37.1

^aPre- and post-noise exposure suprathreshold ABR wave 1 P1-N1 amplitudes at different stimulus frequencies

^bLocations based on genome assembly (NCBI's Build37)

^cNumber of RefSeq genes (NCBI's Build37 assembly) located in the mouse association confidence interval (2.6 Mb)

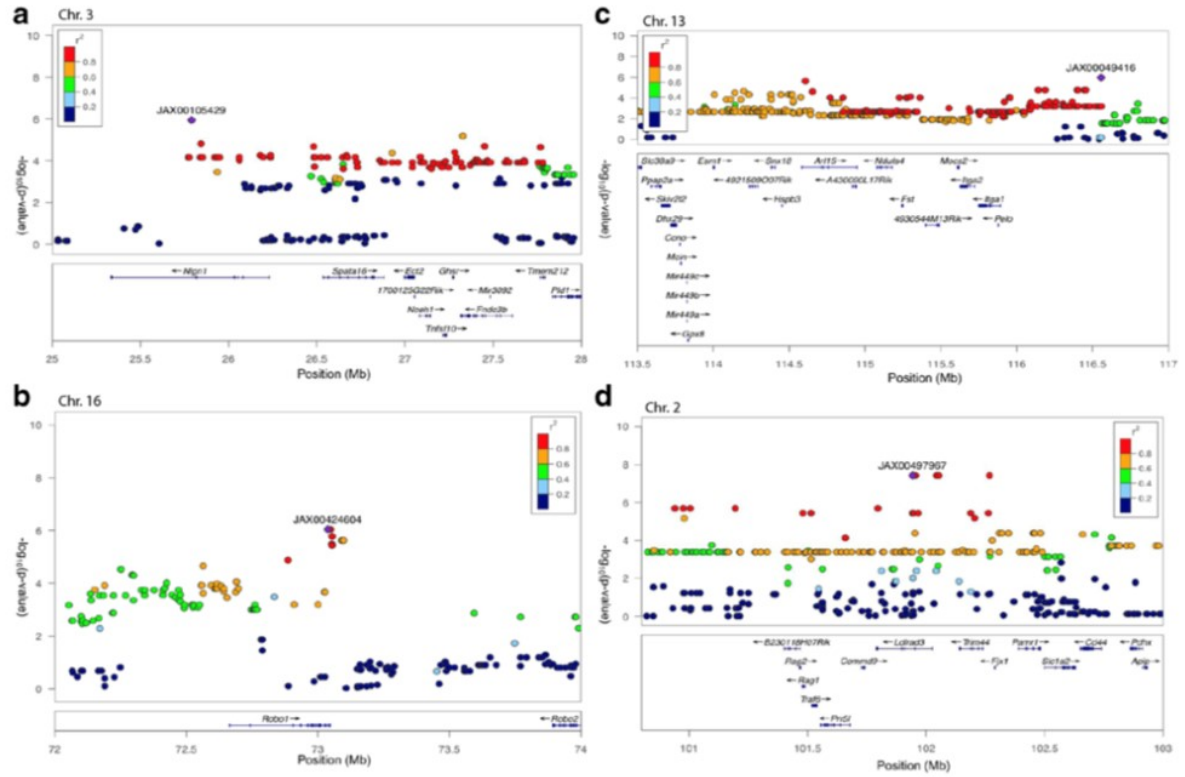


FIG. 6. Genomic interval of the significant association centered on the lead SNP for 24 kHz (a) and 16 kHz (b) pre-noise exposure and 8 kHz (c) and 32 kHz (d) post-noise exposure in 102 HMDP inbred mouse strains. The blue diamond represents the most significant SNP and SNPs are colored based on their LD with the most significant

SNP being red SNPs in LD at $r^2 > 0.8$, orange SNPs in LD at $r^2 > 0.4$ and green SNPs in LD at $r^2 > 0.2$. The positions of all RefSeq genes are plotted using genome locations (NCBI's Build37 genome assembly)

fied genes within each of the intervals regulated by a local eQTL. In order to perform eQTL analysis, we generated gene expression microarray profiles using RNA isolated from cochleae in 64 HMDP strains ($n = 3$ arrays per strain). We then used EMMA to perform an association analysis between all SNPs and array probes mapping within each region. A total of 18,138 genes were represented by at least one probe, after excluding probes that overlapped SNPs present among the classical inbred strains used in the HMDP as describe in the methods.

Loci in which peak SNPs mapped to within 2 Mb of the gene whose expression was regulated were considered "local" or cis-acting eQTLs, while SNPs mapping elsewhere were considered "distal" and presumably trans-acting eQTLs. We calculated the significant p value cutoff ($p = 1 \times 10^{-6}$) for local and distal associations. These genes were prioritized based upon whether they were regulated by a local expression QTL (eQTL). A total of 17 genes (2 genes within Chr. 3 association, 6 genes within Chr. 2 association, and 9 genes within Chr. 13 association) were identified with at least 1 probe whose expression was

regulated by a significant cis eQTL in the cochlea (Table 2). Although there were no cochlear cis-eQTLs identified for genes within the interval associated with the pre-noise suprathreshold wave 1 amplitude derived from the 24 kHz tone-burst stimulus, the lead SNP lies within a region containing only two genes, *Robo1* and *Robo2*, both associated with innervation of the mouse cochlea validating our approach (Wang et al. 2013).

DISCUSSION

This study is the first genome-wide association study in mice using suprathreshold ABR wave 1 amplitude and the first large-scale assessment of this phenotype. The authors acknowledge limitations of this study. First, we measured wave 1 amplitudes at a single stimulus intensity (80 dB SPL) and compared these across strains with varying pre- and post-noise thresholds. A single stimulus level may not activate the same contributing elements across strains and conditions,

TABLE 2

Gene	RefSeq	Chr	txStart (bp) ^a	txEnd (bp) ^b	Local eQTL <i>p</i> ^c
<i>Ghr</i>	ILMN_2872464	3	27,371,351	27,378,010	1.42E-06
<i>Fndc3b</i>	ILMN_2862567	3	27,416,162	27,710,439	2.35E-06
<i>B230118H07Rik</i>	ILMN_2726101	2	101,560,781	101,649,532	3.42E-06
<i>Ldlrad3</i>	ILMN_1217129	2	101,950,203	102,186,385	3.56E-06
<i>Trim44</i>	ILMN_2471289	2	102,300,119	102,407,828	3.6E-06
<i>Cd44</i>	ILMN_3114585	2	102,810,241	102,901,665	3.65E-06
<i>Slc1a2</i>	ILMN_2642339	2	102,658,659	102,790,784	3.82E-06
<i>Traf6</i>	ILMN_2427560	2	101,678,429	101,701,669	3.90E-06
<i>Slc38a9</i>	ILMN_1242435	13	112,660,766	112,738,743	4.01E-06
<i>Esm1</i>	ILMN_1257574	13	113,209,659	113,218,098	2.03E-07
<i>Ndufs4</i>	ILMN_1234521	13	114,287,795	114,388,094	1.84E-06
<i>Ppap2a</i>	ILMN_1222991	13	112,800,894	112,867,881	2.46E-06
<i>Itga1</i>	ILMN_2701778	13	62,677,826	62,783,982	9.28E-07
<i>Dhx29</i>	ILMN_2892376	13	112,927,730	112,969,431	2.58E-06
<i>Pelo</i>	ILMN_2853658	13	115,088,357	115,090,188	2.62E-06
<i>Ccno</i>	ILMN_2736471	13	112,987,802	112,990,778	2.87E-06
<i>Gpx8</i>	ILMN_2653166	13	113,042,763	113,046,388	3.10E-06

^atxStart, location of transcription (NCBI Build37 genome assembly) start^btxEnd, location of transcription (NCBI Build37 genome assembly) end^cStatistically significant *p* value \leq E-06 (Bonferroni corrected for the number of probes tested)

potentially confounding the phenotypic analysis. Also, because of the tail structure of neural frequency tuning curves (Taberner and Liberman 2005), ABR input/output curves are not frequency-place specific. Thus, damage to inner hair cells or neurons at the basal end of the cochlea may impact the apparent size of wave 1 regardless of stimulus frequency. Conversely, tuning curve tails resist changes that pathology often causes at the tips of tuning curves, so that basal injury need not affect wave I at high sound levels as long as the neurons survive. While it remains possible that differences in wave 1 do not reflect true genetic differences in synaptic operation at the cochlear locations targeted by the frequencies we used, the plausibility of the candidate genes we identified supports our approach. These data will assist researchers in the study of genes and pathways involved in cochlear innervation both at baseline and after noise exposure. The HMDP has been used successfully to examine the genetics of a wide array of phenotypes by us and others including plasma lipids (Bennett et al. 2009), bone density (Farber et al. 2011), blood cell traits (Davis et al. 2013), conditioned fear responses (Park et al. 2011), gene-by-diet interactions in obesity (Parks et al. 2013), inflammatory responses (Orozco et al. 2015), age-related hearing loss (Ohmen et al. 2014), NIHL (Lavinsky et al. 2015), diabetes (Parks et al. 2015), and heart failure (Rau et al. 2015). In many of these studies including ours, genes at the identified loci were validated as causal using engineered mouse models and several of them corresponded to loci identified in human GWAS.

Recent expansion of the depth of genotyping and the number of HMDP strains has led to an increase in the number of significant associations detected (Rau et al. 2015). There exist additional resources for the study of complex traits in mice such as the Collaborative Cross (CC), outbred rodent populations (OS), and Chromosome Substitution Strains (CSS) that have the added advantage of wild strain variation and the potential for identifying additional loci (Buchner and Nadeau 2015). The HMDP has the advantage of genomic homozygosity and complete reproducibility of phenotypic measurements and recent additions to the HMDP including the addition of ~75 additional strains and higher density SNP genotyping have substantially increased the power and genomic coverage (Rau et al. 2015). Although the HMDP may not capture SNP variation from wild strains, the limitations of the other resources, including the need for whole genome genotyping of successive generations in the OS and CC and the need for generation of subcongenics in the CSS compelled us to use the HMDP resource.

Our data showed a broad range of suprathreshold ABR wave 1 amplitudes with a discernable pattern detected prior and after noise exposure across HMDP strains and a significant small inverse correlation between ABR wave 1 amplitudes values and their corresponding ABR thresholds. Using ABR measurement, we and others previously identified several distinct patterns of baseline hearing deficits (Zheng et al. 1999) (Myint et al. 2016). We have also characterized several distinct patterns of noise-

sensitivity using HMDP strains (Myint et al. 2016). This strain associated variation in ABR amplitudes presented here support the hypothesis that this phenotype has a genetic background.

The analysis of synaptic counts from the 4 extreme strains representing the lowest and the highest ABR wave 1 measurement prior and after noise exposure supported the hypothesis that the number of functional IHC synapses varied in conjunction with the corresponding wave 1 amplitude values and that ABR P1-N1 amplitude can be used as a reliable metric to indirectly analyze the synaptic function and synaptopathy in large populations. Sergeyenko et al. (2013) have shown that loss of IHC synapses correlate with decrease in wave 1 amplitude. Although the significant variation in synapses count between the strains presented in pre-noise condition may not have reflected the full-scale difference in ABR wave 1 amplitude measures, synaptopathy can present itself in the form of abnormal Synaptic function instead of the more common absence of these synapses, particularly at baseline condition. Recently, *Clrn1^{ex4fl/fl}* *Myo15-Cre^{+/-}* a mouse model lacking a variant of *Clarín1* was shown to have diminished wave I amplitude, defective exocytosis and disorganized distribution of $\text{Ca}_v1.3 \text{ Ca}^{2+}$ channels (Dulon et al. 2018). *Otof^{C2C/C2C}* is another model lacking an otoferlin functional C2C calcium binding site, showed reduced ABR wave I amplitude and disrupted vesicle pool replenishment compared with their wildtype controls (Michalski et al. 2017). These two models presented similar synapses numbers to theirs control despite the apparent synaptopathy.

Our GWAS generated significant associations in two regions for baseline hearing and another two separate regions after exposure to damaging noise generating a total 50 identified candidate genes. Using our cochlear gene expression data and eQTL analysis we were able to narrow down candidate genes substantially. Our findings demonstrate that the genetic architecture of noise induced cochlear synaptopathy is distinct from that of baseline auditory nerve/synapse integrity.

One locus at baseline and two loci at post-exposure to noise had at least two genes within the association peak regulated by a significant local cochlear eQTL (Table 2) and the other locus resides within a region containing only two genes, *Robo1* and *Robo2*. All 17 candidate genes with *cis*-eQTLs, are expressed within the cells of the cochlear epithelium and spiral ganglion (<https://umgear.org/>).

Slc1a2 is a strong candidate for the 32-kHz (post-noise exposure) locus based on our cochlear eQTL data. *Slc1a2* encodes a member of a family of solute transporter proteins (Arriza et al. 1994). This membrane-bound protein is the key transporter that clears the excitatory neurotransmitter glutamate from the extracellular space at synapses in the nervous system. Glutamate clearance is

required for precise synaptic activation and to prevent neuronal damage from excessive activation of glutamate receptors. The synapse is composed of a presynaptic ribbon enclosed by a halo of neurotransmitter-containing vesicles within the inner hair cells (Nouvian et al. 2006) and a postsynaptic active zone on the cochlear nerve terminal with glutamate (AMPA-type) receptors for the released neurotransmitter (Puel et al. 1995). Abnormal regulation of this gene is thought to be related to several neurological disorders (Xu et al. 2016). Puel et al. (1998) has shown that local application of glutamate receptor (GluR) agonists can produce dose-dependent swelling of cochlear nerve terminals contacting IHCs. The dendritic inflammation is observed under inner hair cells, but not outer hair cells, and is prevented by prior intracochlear perfusion of glutamate antagonists (Ruel et al. 2007). Based on conjectures (Kujawa and Liberman 2009), this excitotoxicity would be a primary initial insult in the inflammatory cascade observed after noise. Thus, *Slc1a2* could play an important role in the susceptibility to noise-induced cochlear synaptopathy by regulating the glutamate clearance after exposure.

Neuroglin1, a candidate gene at the 24-kHz (pre-noise exposure) locus, is a synaptic cell adhesion molecule that connects pre- and post-synaptic neurons. *Neuroglin1* is responsible for signaling across the synapse which regulates synaptic activity and determines the properties of neuronal networks (Gjølund et al. 2012) but has no known function in the auditory system.

Wang et al., 2013 have previously demonstrated that both *Robo1* and *Robo2* were actively expressed by spiral ganglion neurons. Also, in *Robo1/2* double mutants at E18, spiral ganglion neurons were dislocated in the space dorsal to the cochlear epithelium and did not innervate hair cells. Thus, *Robo* signaling mediates spatial positioning of spiral ganglion neurons during development of cochlear. Interestingly, there were no significant alterations of the overall cochlear structure in *Robo1/2* double mutants in comparison with their heterozygous littermates (hair cells persisted unaffected) (Wang et al. 2013). Thus, our baseline GWAS data on chromosome 16 with the peak SNP within *Robo1* validates our approach.

Future studies will be dedicated to the validation of candidate genes through the analyses of the strains with the most extreme phenotypes and the use of transgenic and/or CRISPR models.

CONCLUSIONS

We have performed the first comprehensive analysis of suprathreshold ABR wave 1 amplitude in mice and

have begun to elucidate the genetic architecture of the auditory hair cell synapse and the susceptibility to noise-induced cochlear synaptopathy. We identified multiple novel loci and, using our cochlear eQTLs, we prioritized positional candidate genes. These findings validate the utility of the HMDP for detecting genes related to auditory function and provide potential candidates for more in-depth analyses.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Mills Auditory Foundation.

Funding Information This work was supported by National Institutes of Health National Institute on Deafness and Other Communication Disorders grants R01DC010856-01 to R.A.F. National Institutes of Health grants R01ES021801, 3R01ES021801-03S1, UL1TR000130, P30ES007048 and Environmental Protection Agency grant RD83544101 grant to H.A.; the funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

The Institutional Care and Use Committee (IACUC) at University of California San Diego (IACUC 17178) and University of Southern California (IACUC 12033) endorsed the animal protocol for the Hybrid Mouse Diversity Panel (HMDP) inbred strains.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

- ARRIZA JL, FAIRMAN WA, WADICHE JI, MURDOCH GH, KAVANAUGH MP, AMARA SG (1994) Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci* 14:5559–5569
- BENNETT BJ, WANG SS, WANG X, WU X, LUSIS AJ (2009) Genetic regulation of atherosclerotic plaque size and morphology in the innominate artery of hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(3):348–355
- BENNETT BJ, FARBER CR, OROZCO L, KANG HM, GHAZALPOUR A, SIEMERS N, NEUBAUER M, NEUHAUS I, YORDANOVA R, GUAN B, TRUONG A, YANG WP, HE A, KAYNE P, GARGALOVIC P, KIRCHGESSNER T, PAN C, CASTELLANI LW, KOSTEM E, FURLOTTE N, DRAKE TA, ESKIN E, LUSIS AJ (2010) A high-resolution association mapping panel for the dissection of complex traits in mice. *Genome Res* 20(2):281–290
- BUCHNER DA, NADEAU JH (2015) Contrasting genetic architectures in different mouse reference populations used for studying complex traits. *Genome Res* 25(6):775–791
- CROW AL, OHMEN J, WANG J, LAVINSKY J, HARTIALA J, LI Q, LI X, SALEHIDE P, ESKIN E, PAN C, LUSIS AJ, ALLAYEE H, FRIEDMAN RA (2015) The genetic architecture of hearing impairment in mice: evidence for frequency-specific genetic determinants. *G3 (Bethesda)* 5(11):2329–2339
- DAVIS RC, VAN NAS A, BENNETT B, OROZCO L, PAN C, RAU CD, ESKIN E, LUSIS AJ (2013) Genome-wide association mapping of blood cell traits in mice. *Mamm Genome* 24(3–4):105–118
- DULON D, PAPAL S, PATNI P, CORTESE M, VINCENT PFY, TERTRAIS M, EMPTOZ A ET AL (2018) Clarin-1 gene transfer rescues auditory synaptopathy in model of Usher syndrome. *J Clin Invest* 128(8):3382–3401
- EYBALIN M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73:309–373
- FARBER CR, BENNETT BJ, OROZCO L, ZOU W, LIRA A, KOSTEM E, KANG HM, FURLOTTE N, BERBERYAN A, GHAZALPOUR A, SUWANWELA J, DRAKE TA, ESKIN E, WANG QT, TEITELBAUM SL, LUSIS AJ (2011 Apr) Mouse genome-wide association and systems genetics identify *Axl2* as a regulator of bone mineral density and osteoclastogenesis. *PLoS Genet* 7(4):e1002038
- GJØRLUND MD, NIELSEN J, PANKRATOVA S, LI S, KORSHUNOVA I, BOCK E, BEREZIN V (2012) Neuroligin1 induces neurite outgrowth through an interaction with Neuexin-1 β and activation of fibroblast growth factor receptor-1. *FASEB J* 26(10):4174–4186
- KANG HM, ZAITLEN NA, WADE CM, KIRBY A, HECKERMAN D, DALY MJ, ESKIN E (2008) Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics* 178:1709–1723
- KOBEL M, LE PRELL CG, LIU J, HAWKS JW, BAO J (2017 JUN) Noise-induced cochlear synaptopathy: past findings and future studies. *Hear Res* 349:148–154
- KUJAWA SG, LIBERMAN MC (2009) Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after temporary noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 29: 14077–14085
- KUJAWA SG, LIBERMAN MC (2015) Synaptopathy in the noise-exposed and aging cochlea: primary neural degeneration in acquired sensorineural hearing loss. *Hear Res* 330:191–199
- LAVINSKY J, CROW AL, PAN C, WANG J, AARON KA, HO MK, LI Q, SALEHIDE P, MYINT A, MONGES-HERNADEZ M, ESKIN E, ALLAYEE H, LUSIS AJ, FRIEDMAN RA (2015) Genome-wide association study identifies *nox3* as a critical gene for susceptibility to noise-induced hearing loss. *PLoS Genet* 11(4):e1005094
- LAVINSKY J, GE M, CROW AL, PAN C, WANG J, SALEHI P, MYINT A, ESKIN E, ALLAYEE H, LUSIS AJ, FRIEDMAN RA (2016) The genetic architecture of noise-induced hearing loss: evidence for a gene-by-environment interaction. *G3 (Bethesda)* 6(10):3219–3228
- LIBERMAN MC (2017) Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. *F1000Res* 6:927
- LIBERMAN MC, KUJAWA SG (2017) Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: manifestations and mechanisms. *Hear Res* 349:138–147
- LIBERMAN MC, EPSTEIN MJ, CLEVELAND SS, WANG H, MAISON SF (2016) Toward a differential diagnosis of hidden hearing loss in humans. *PLoS One* 11(9):e0162726
- LIPPERT C, LISTGARTEN J, LIU Y, KADIE CM, DAVIDSON RI, HECKERMAN D (2011) FaST linear mixed models for genome-wide association studies. *Nat Methods* 8(10):833–835
- MICHALSKI N, GOUTMAN JD, AUCLAIR SM, DE MONVEL JB, TERTRAIS M, EMPTOZ A, PARRIN A ET AL (2017) Otoferlin acts as a Ca²⁺ sensor for vesicle fusion and vesicle pool replenishment at auditory hair cell ribbon synapses. *Elife* 6:e31013
- MÜLLER M, VON HÜNERBEIN K, HOIDIS S, SMOLDERS JW (2005) A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear Res* 202:63–73. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.08.011>

- MYINT A, WHITE CH, OHMEN JD, LI X, WANG J, LAVINSKY J, SALEHI P, CROW AL, OHYAMA T, FRIEDMAN RA (2016) Large-scale phenotyping of noise-induced hearing loss in 100 strains of mice. *Hear Res* 332:113–120
- NOUVIAN R, BEUTNER D, PARSONS TD, MOSER T (2006) Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membr Biol* 209(2–3):153–165
- OHMEN J, KANG EY, LI X, JOO JW, HORMOZDIARI F, ZHENG QY, DAVIS RC, LUSIS AJ, ESKIN E, FRIEDMAN RA (2014) Genome-wide association study for age-related hearing loss (AHL) in the mouse: a meta-analysis. *J Assoc Res Otolaryngol* 15(3):335–352
- OROZCO LD, MORSELLI M, RUBBI L, GUO W, GO J, SHI H, LOPEZ D, FURLOTTE NA, BENNETT BJ, FARBER CR, GHAZALPOUR A, ZHANG MQ, BAHOUS R, ROZEN R, LUSIS AJ, PELLEGRINI M (2015) Epigenome-wide association of liver methylation patterns and complex metabolic traits in mice. *Cell Metab* 21(6):905–917
- PARK CC, GALE GD, DE JONG S, GHAZALPOUR A, BENNETT BJ, FARBER CR, LANGFELDER P, LIN A, KHAN AH, ESKIN E, HORVATH S, LUSIS AJ, OPHOFF RA, SMITH DJ (2011) Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC Syst Biol* 5:43
- PARKS BW, NAM E, ORG E, KOSTEM E, NORHEIM F, HUI ST, PAN C, CIVELEK M, RAU CD, BENNETT BJ, MEHRABIAN M, URSELL LK, HE A, CASTELLANI LW, ZINKER B, KIRBY M, DRAKE TA, DREVON CA, KNIGHT R, GARGALOVIC P, KIRCHGESSNER T, ESKIN E, LUSIS AJ (2013) Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metab* 17(1):141–152
- PARKS BW, SALLAM T, MEHRABIAN M, PSYCHOOGIOS N, HUI ST, NORHEIM F, CASTELLANI LW, RAU CD, PAN C, PHUN J, ZHOU Z, YANG WP, NEUHAUS I, GARGALOVIC PS, KIRCHGESSNER TG, GRAHAM M, LEE R, TONTONOS P, GERSZTEN RE, HEVENER AL, LUSIS AJ (2015) Genetic architecture of insulin resistance in the mouse. *Cell Metab* 21(2):334–347
- PUEL JL, SAFFIEDINE S, GERVAIS D'ALDIN C, EYBALIN M, PUJOL R (1995) Synaptic regeneration and functional recovery after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *C R Acad Sci III* 318(1):67–75
- PUEL J-L, RUEL J, D'ALDIN CG, PUJOL R (1998) Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *NeuroReport* 9:2109e2114
- RAU CD, PARKS B, WANG Y, ESKIN E, SIMECEK P, CHURCHILL GA, LUSIS AJ (2015) High-density genotypes of inbred mouse strains: improved power and precision of association mapping. *G3 (Bethesda)* 5(10):2021–2026
- RUEL J, WANG J, REBILLARD G, EYBALIN M, LLOYD R, PUJOL R, PUEL JL (2007) Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear Res* 227(1–2):19–27
- SCHUKNECHT HF (1964 OCT) Further observations on the pathology of Presbycusis. *Arch Otolaryngol* 80:369–368
- SERGEYENKO Y, LALL K, LIBERMAN MC, KUJAWA S (2013) Age-related cochlear synaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline. *J Neurosci* 33:13686e13694
- SHI L, CHANG Y, LI X, AIKEN S, LIU L, WANG J (2016) Cochlear synaptopathy and noise-induced hidden hearing loss. *Neural Plast* 2016:6143164
- TABERNER AM, LIBERMAN MC (2005) Response properties of single auditory nerve fibers in the mouse. *J Neurophysiol* 93(1):557–569
- VAN NAS A, INGRAM-DRAKE L, SINSHEIMER JS, WANG SS, SCHATZ EE, DRAKE T, LUSIS AJ (2010) Expression quantitative trait loci: replication, tissue- and sex-specificity in mice. *Genetics* 185(3):1059–1068
- WANG SZ, IBRAHIM LA, KIM YJ, GIBSON DA, LEUNG HC, YUAN W, ZHANG KK, TAO HW, MA L, ZHANG LI (2013) Slit/Robo signaling mediates spatial positioning of spiral ganglion neurons during development of cochlear innervation. *J Neurosci* 33(30):12242–12254
- WHITE CH, OHMEN JD, SHETH S, ZEBBOUDJ AF, MCHUGH RK ET AL (2009) Genome-wide screening for genetic loci associated with noise-induced hearing loss. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 20:207–213
- XU Y, CAO B, CHEN Y, OU R, WEI Q, YANG J, ZHAO B, SONG W, SHANG HF (2016) SLC1A2 rs3794087 are associated with susceptibility to Parkinson's disease, but not essential tremor, amyotrophic lateral sclerosis or multiple system atrophy in a Chinese population. *J Neurol Sci* 365:96–100
- ZHENG QY, JOHNSON KR, ERWAY LC (1999) Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hear Res* 130:94–107

